
BC

biochimica clinica

In questo numero:

NOVITÀ EDITORIALI

vedi pag. 5

VACCINI NELLA PANDEMIA DA SARS-CoV-2

vedi pag. 6, 9, 16

SIBioC - Medicina di Laboratorio

membro di

SIBioC
Medicina di Laboratorio

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

SIBioC
Medicina di Laboratorio

 **BIOMEDIA**
La condivisione del sapere

sommario

EDITORIALI

5

Novità editoriali
Comitato di Redazione

6

Il contributo della Medicina di Laboratorio nella campagna vaccinale anti COVID-19
G. Lippi, C. Mattiuzzi

RASSEGNE

9

SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini Parte I: Introduzione sulle tipologie dei vaccini e sui loro meccanismi di azione
C. Puricelli, B. Carnaghi, U. Dianzani, R. Rolla

16

SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini Parte II: I vaccini oggi in uso per contrastare la pandemia da COVID-19 e il ruolo del laboratorio nella campagna vaccinale
C. Puricelli, B. Carnaghi, U. Dianzani, R. Rolla

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

34

Measurement of biotinidase activity using dried blood spots by a spectrophotometric assay
M. Ahram, M. Aladawi, O. Dwekat, L. Zaghlol, S. Al Bdour, A. Masri

39

Screening tossicologico su matrice pilifera: verifica delle prestazioni analitiche secondo lo standard internazionale ISO 15189
M. Stornaiuolo, M. Marinova, C. Artusi, M. Zaninotto, M. Plebani

45

Applicazione del Sistema Toyota alla fase pre-analitica come azione di miglioramento a seguito di un evento avverso: l'esperienza del Laboratorio Analisi dell'Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA)
M. Matera, A. Tomei, M. Vezzosi, F. Balboni

51

Errori di identificazione del paziente: un progetto SIBioC orientato alla gestione di un problema persistente
A. Aifa, A. Padoan, R. Guerranti, M. Fiorini, C. Bellini, F. Tosato, M. Pelloso, E. Piva, R. Pajola, M. Lorubbio, B. Cremonesi, A. Bassi, R. Rolla, G. Introcaso, M. Plebani, S. Buoro, F. Balboni

58

Studio sulla presenza di componenti monoclonali in pazienti con infezione da SARS-CoV-2: dati preliminari
R. Marinelli, A. Sartorio, V. Muraro, F. Formenton, F. Pennetta, E. Simoni, G. Casoni, A. Mazza, S. Cuppini, A. Camerotto

62

Emoglobina glicata (HbA1c): confronto tra gli analizzatori Premier Hb9210 e ADAMStm A1c HA-8180V
G. Parigi, A.L. Toni, C. Scapellato, M. Longini

68

Performance evaluation of ARKRAY HA-8190V system for measuring glycated hemoglobin
R. Paleari, F. Ceriotti, A. Mosca

sommario

OPINIONI

74

Ethics in Laboratory Medicine: lessons from the COVID-19 pandemic
M. Plebani

DOCUMENTI

78

Determinazione e utilizzo clinico di autoanticorpi e/o di profili autoanticorpali nelle malattie epatiche autoimmuni – aggiornamento 2021
C. Bonaguri, A. Melegari, A. Russo, A. Picanza, R. Minerba, E. De Santis, T. Trenti – per il Gruppo di Studio SIBioC Autoimmunità

LETTERE ALL'EDITORE

83

Longitudinal monitoring of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies after BNT162b2 vaccination in healthcare workers
G. Salvagno, B.M. Henry, L. Pighi, S. De Nitto, G. Gianfilippi, G. Lippi

NOTIZIE SIBioC

86

Labtestonline nel 2021
F. Biancalani, M. Berardi, G. Messeri

ERRATA CORRIGE

88

Elementi utili per implementare un sistema per il controllo dell'accuratezza dei risultati nella diagnostica di SARS-COV-2 (RNA virale, antigeni e anticorpi)
S.M. Mattioli, M. Quercioli, S. Buoro, P. Pecile, M.G. Colao, E. Pariani, C. Ottomano, D. Brugnoli

CASI CLINICI

e1

Hematocrit interference in coagulation tests: what else can we do?
N. Del Amo Del Arco, M. Caballero Ruiz, L.M. Cruz Carlos, M.D. Botías, S.P. Fornies, R.G. Santos, M.I. Escuer, I.L. Lombarte, M.E. Marquez Beltrí, F.J.M. de la Torre, E.E. Moreno Compy, J.P. Labiano, M.D. Alcorta

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

Chiara Riva
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 2022-2023

Anna Carobene
Ciriaco Carru
Marcello Ciaccio
Antonio Fortunato
Giuseppe Lippi
Gavino Napolitano
Enza Pavanello
Roberta Rolla
Stefano Angelo Santini
Laura Sciacovelli *Past president*
Tommaso Trenti *Presidente*

Volume 46

Numero 1 - Marzo 2022

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Autorizzazione del
Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987



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

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



Associato all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

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.

Novità Editoriali

Cari Soci e Lettori,
desideriamo condividere con tutti voi alcune novità importanti relative alla gestione della nostra rivista, che si andranno a concretizzare nel corso del 2022.

Questi cambiamenti hanno essenzialmente lo scopo di promuovere la visibilità di *Biochimica Clinica* sulle piattaforme internazionali e di aumentarne la fruibilità, rendendo nel contempo il processo editoriale più efficiente e più veloce.

Lo scopo primario di BC resta comunque quello di essere un riferimento culturale e formativo per i Soci, lo strumento principale attraverso il quale ogni Socio può condividere con la nostra comunità professionale le proprie opinioni e/o i risultati delle proprie ricerche, nonché il veicolo per la diffusione dei Documenti Societari e degli elaborati dei Gruppi di Studio.

Trovate qui di seguito un elenco di questi cambiamenti:

- **Uso della lingua Inglese.** La fruibilità dei contenuti della rivista, anche a livello internazionale, richiede necessariamente un maggiore utilizzo della lingua Inglese. Per tale ragione, si incoraggiano gli autori a scrivere i loro contributi in Inglese. La scrittura in Inglese non sarà tuttavia obbligatoria: BC continuerà ad accettare e a pubblicare contributi nelle due lingue.

Il corretto uso della lingua inglese è ovviamente necessario e sarà oggetto della revisione dei manoscritti, al pari della valutazione scientifica. Gli Autori che non si sentono particolarmente esperti nell'utilizzo dell'Inglese scientifico potranno servirsi di servizi di traduzione o, in alternativa, potranno continuare a sottomettere i lavori in Italiano. I Documenti Societari dovranno essere obbligatoriamente redatti in Inglese; tuttavia, per garantire la più ampia diffusione di questi contenuti fra i Soci, di questi Documenti verrà pubblicata anche la versione in Italiano. Anche di altri contributi, ritenuti particolarmente rilevanti, potrà essere pubblicata la versione in Italiano.

- **Disponibilità dei contenuti.** Al momento gli articoli di BC sono resi disponibili a tutti (Soci e non-Soci) dopo 12 mesi dalla pubblicazione, tranne i Documenti Societari che sono fruibili fin da subito. Anche tutti gli articoli relativi alla pandemia in corso, analogamente a quanto adottato da tutte le riviste scientifiche, sono immediatamente fruibili. Dal 2022, altri contributi considerati particolarmente rilevanti potranno essere ugualmente resi disponibili fin dal momento della pubblicazione. Fra questi si possono includere i contenuti dei volumi monografici e gli articoli della serie "Temi Etici" che BC sta man mano pubblicando. Anche questa operazione va nella direzione di una maggiore visibilità della rivista.
- **Nuovo sito.** È in programma il rifacimento del sito di BC, per renderlo graficamente più gradevole, ma soprattutto più facilmente accessibile e con una navigazione più semplice. La ricerca dei contenuti di BC negli archivi sarà più facile e più immediata.
- **Scholar One.** Verrà adottata la piattaforma Scholar One per la gestione online di tutto il processo editoriale. Questo garantirà una velocizzazione del processo di valutazione degli articoli sottoposti e un controllo più stringente dei tempi editoriali.
- **Copia cartacea.** Da quest'anno cessa la stampa della rivista, che sarà di conseguenza disponibile solo online. È una scelta obbligata, dovuta agli elevati costi di stampa, già da qualche anno non coperti dalla quota aggiuntiva alla quota societaria annuale, scelta operata un numero sempre minore di Soci. È una via seguita ormai dalla maggioranza delle riviste scientifiche, sia nazionali che internazionali.

Ci auguriamo che queste modifiche nella gestione della rivista portino ai risultati che ci siamo prefissi.

I componenti del Comitato Editoriale e la Segreteria di Redazione sono a disposizione, come sempre, per ogni eventuale chiarimento o suggerimento che vogliate dare.

Vi auguriamo di cuore un buon proseguimento d'anno.

Il Direttore Scientifico
Maria Stella Graziani

Il Comitato di Redazione
Francesco Busardò, Ferruccio Ceriotti, Davide Giavarina, Bruna Lo Sasso, Giampaolo Merlini, Martina Montagnana, Andrea Mosca, Paola Pezzati, Rossella Tomaiuolo, Matteo Vidali, Martina Zaninotto

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, 37134 Verona,
E-mail mariastella@graziani.eu

Ricevuto: 19.01.2022

Accettato: 24.01.2022

Pubblicato on-line: 25.02.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.006

Il contributo della Medicina di Laboratorio nella campagna vaccinale anti COVID-19

Giuseppe Lippi¹, Camilla Mattiuzzi²

¹Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona

²Servizio di Governance Clinica, Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento, Trento

La malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), sostenuta dal virus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), rappresenta la più ampia e tragica pandemia che abbia travolto il genere umano dai tempi della cosiddetta epidemia Spagnola, sostenuta dal virus dell'Influenza A H1N1, e che causò oltre 50 milioni di morti nel 1918-19 (1). Al momento di scrivere questo editoriale, (Novembre 2021), secondo i dati aggiornati della John Hopkins University, SARS-CoV-2 ha infettato oltre 250 milioni di persone nel mondo (quasi 5 milioni in Italia), causando oltre 5,1 milioni di morti (oltre 132 mila solo in Italia). Nonostante i considerevoli progressi compiuti nella comprensione dei meccanismi patogenetici alla base di COVID-19 e i conseguenti miglioramenti nella gestione clinico-terapeutica, la diffusione del virus sembra virtualmente inarrestabile. L'utilizzo di misure di contenimento "fisiche" (mascherine, distanziamento sociale, igiene delle mani) è certamente idoneo, ma non sufficiente, a contenere il contagio (2), cosicché – in analogia ad altre malattie infettive – i vaccini divengono uno (lo) strumento cardine per limitare la diffusione del virus e mitigarne le drammatiche conseguenze. A mero titolo informativo, si stima che la sola vaccinazione contro dieci comuni malattie infettive abbia consentito di evitare 50 milioni di morti nel primo ventennio di questo secolo, e che possa prevenirne altri 47 milioni nei prossimi 10 anni (3). Solo questi numeri basterebbero a far comprendere quanto la vaccinazione abbia mitigato, e soprattutto quanto lo possa fare in futuro, l'impatto delle malattie infettive sul benessere collettivo, sui sistemi sanitari, sulla società ed anche sull'economia.

Senza entrare nel merito specifico della differente composizione, formulazione e meccanismo d'azione dei vaccini anti COVID-19, oggetto di due brillanti articoli di revisione pubblicati da Puricelli et al. in questo numero della rivista (4,5), appare importante sottolineare il rilevante contributo che la Medicina di Laboratorio possa offrire nell'ambito della campagna vaccinale anti COVID-19.

In un'accezione olistica, la Medicina di Laboratorio può essere definita disciplina "i cui risultati si traducono in informazioni utili (se non indispensabili) a migliorare la cura e/o mantenere il benessere della popolazione" (6). In questo preciso contesto si colloca il possibile utilizzo di esami di laboratorio per supportare le Autorità governative e/o sanitarie nell'ottimizzazione dei protocolli vaccinali. Prima di entrare nello specifico, giova ricordare come l'efficacia clinica di un vaccino possa essere valutata a vari livelli, utilizzando diversi indicatori, quali prevenzione dell'infezione, riduzione della carica infettiva nei soggetti infettati, attenuazione della sintomatologia, prevenzione dell'ospedalizzazione e del ricovero in terapia intensiva e, infine, riduzione della mortalità. Questi esiti clinici sono influenzati dall'efficacia della formulazione vaccinale, ma anche da variabili individuali (demografiche, cliniche e biologiche) nella risposta vaccinale, tra le quali rientrano la risposta immunitaria umorale (anticorpale), la risposta immunitaria cellulo-mediata (cellulare) e la memoria immunologica. In che misura gli esami di laboratorio possano aiutare a decifrare la risposta immunitaria pre- e post-vaccinale e supportare, quindi, la campagna vaccinale è ancora oggetto di accesi dibattiti istituzionali, cui la Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) ha contribuito con articoli pubblicati su questa stessa rivista (7,8).

Nondimeno, nuove evidenze rese disponibili dalla letteratura scientifica sembrano rafforzare la convinzione che la Medicina di Laboratorio possa giocare un ruolo importante nella caratterizzazione della risposta immunitaria e supportare, quindi, la programmazione della campagna vaccinale contro COVID-19, così come riassunto nella Tabella 1. Un aspetto particolarmente interessante è la possibilità di identificare soggetti con pregressa infezione asintomatica da SARS-CoV-2 (in media fino al 70% della popolazione) (9) ed elevato titolo anticorpale pre-vaccinale, che si rende possibile solo mediante accertamento di sieropositività. Oltre alla comprensibile inopportunità di innalzare ulteriormente una risposta immunitaria già sufficiente a contrastare il virus (e le sue varianti),

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10, 37134 Verona, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 15.11.2021

Accettato: 16.11.2021

Pubblicato on-line: 25.11.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.073

Tabella 1

Significato clinico degli esami di laboratorio nella caratterizzazione della risposta immunitaria e nella gestione della campagna vaccinale anti COVID-19

Priorizzare vaccinazione in:

- Soggetti sieronegativi (senza pregressa infezione da SARS-CoV-2)
- Soggetti sieropositivi (con pregressa infezione da SARS-CoV-2) ma ridotto titolo anticorpale

Somministrare dosi aggiuntive (booster) in:

- Soggetti vaccinati con limitata risposta umorale e/o cellulare (immunodepressi, pazienti oncologici, ecc.)
- Soggetti con prematuro decadimento della risposta umorale e/o cellulare (anziani, polipatologici, dializzati, ecc.)

la somministrazione del vaccino si può associare a maggiore incidenza di effetti collaterali in soggetti con elevati livelli di anticorpi, come dimostrato dallo studio di Tissot et al. (10). L'opportunità di priorizzare la somministrazione di dosi aggiuntive di vaccino (i cosiddetti "booster") a fasce specifiche della popolazione è un altro aspetto che assume particolare rilievo, soprattutto a seguito della pubblicazione di un'analisi epidemiologica su scala nazionale condotta in Israele, che evidenzia come la somministrazione della dose aggiuntiva del vaccino mRNA BNT162b2 a distanza di 6 mesi dalla fine del ciclo vaccinale primario, dimostri un'efficacia di oltre il 90% nel prevenire il rischio di sviluppare malattia grave e ospedalizzazione per COVID-19 rispetto alla sola seconda dose (11). Ciò va di pari passo con l'evidenza che il tasso delle cosiddette "breakthrough (SARS-CoV-2) infections", cioè infezioni virali che coinvolgono soggetti vaccinati, aumenta progressivamente nel tempo ed è più probabile a seguito del decadimento del titolo di anticorpi neutralizzanti il virus (12).

A fronte di questi aspetti, che appaiono oggi incontrovertibili, permangono alcune aree meno certe e definite. A prescindere dall'introduzione di uno standard internazionale per il monitoraggio sierologico (NIBSC code 20/136), l'armonizzazione degli immunodosaggi per la quantificazione degli anticorpi (neutralizzanti) anti-SARS-CoV-2 è ancora lontana (13). Soprattutto, cominciano solo ora a emergere dati che correlano il titolo anticorpale espresso in Binding Antibodies Unit (BAU) con il grado di protezione dall'infezione (14). Malgrado la maggior parte degli immunodosaggi per anticorpi contro la proteina spike o il suo dominio di legame recettoriale (receptor binding domain, RBD) oggi disponibili in commercio, dimostrino buona correlazione con i test di neutralizzazione (15), non esistono indicazioni definitive in merito al tipo di misura in grado di garantire le migliori prestazioni in termini di correlazione con il potenziale neutralizzante del siero e/o del plasma (anticorpi totali, IgG o IgA; anti-spike o anti-RBD). Ancora meno chiaro è il ruolo dei test commerciali rivolti alla valutazione della risposta cellulosa-mediata, basati sul principio della stimolazione linfocitaria e quantificazione del rilascio di interferone gamma. Malgrado alcune indagini preliminari dimostrino i possibili vantaggi derivanti dall'utilizzo di queste metodiche per monitorare la risposta cellulare post-vaccinale (16,17), non esiste tuttora una correlazione attendibile tra i valori ottenuti con questi test e la presunta efficacia vaccinale.

In conclusione, negare o ignorare il potenziale contributo che la Medicina di Laboratorio possa offrire oggi nell'ambito della gestione della campagna vaccinale anti COVID-19 appare poco saggio e lungimirante (18), considerando soprattutto il costo elevato e le considerevoli difficoltà incontrate nell'approvvigionamento dei vaccini, la necessità di raggiungere un'ampia immunità di gregge al fine di limitare la circolazione del virus (fino al 90% della popolazione dovrebbe essere immunizzata) e la verosimile necessità di ricorrere a "richiami" (dosi booster) relativamente frequenti per evitare il decadimento della protezione immunitaria (19,20). Nondimeno, è necessario stimolare la ricerca biomedica al fine di ottenere altre informazioni biologiche, analitiche, cliniche e logistiche, che consentano di giungere alla definizione di un pannello di esami di laboratorio che si riveli concretamente efficace per contribuire all'ottimizzazione della campagna vaccinale anti COVID-19.

BIBLIOGRAFIA

1. Sampath S, Khedr A, Qamar S, et al. Pandemics throughout the history. *Cureus* 2021;13:e18136.
2. Borchering RK, Viboud C, Howerton E, et al. Modeling of future COVID-19 Cases, hospitalizations, and deaths, by vaccination rates and nonpharmaceutical intervention scenarios - United States, April-September 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021;70:719-24.
3. Toor J, Echeverria-Londono S, Li X, et al. Lives saved with vaccination for 10 pathogens across 112 countries in a pre-COVID-19 world. *Elife* 2021;10:e67635.
4. Puricelli C, Carnaghi B, Dianzani U, et al. SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini Parte I: Introduzione sulle tipologie dei vaccini e sui loro meccanismi di azione. *Biochim Clin* 2022;46:9-15.
5. Puricelli C, Carnaghi B, Dianzani U, et al. SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini Parte II: I vaccini oggi in uso per contrastare la pandemia da COVID-19 e il ruolo del laboratorio nella campagna vaccinale. *Biochim Clin* 2022;46:16-33.
6. Lippi G, Plebani M. A modern and pragmatic definition of Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1171.
7. Lippi G, Sciacovelli L, Trenti T, et al. Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali. *Biochim Clin* 2021;45:87-9.

8. Plebani M, Banfi G, Lippi G. Valutazione della risposta anticorpale post-vaccino COVID-19: fiat lux. *Biochim Clin* 2021;45:228-9.
9. Oran DP, Topol EJ. The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic. *Ann Intern Med* 2021;174:1344-5.
10. Tissot N, Brunel AS, Bozon F, et al. Patients with history of COVID-19 had more side effects after the first dose of COVID-19 vaccine. *Vaccine* 2021;39:5087-90.
11. Barda N, Dagan N, Cohen C, et al. Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *Lancet* 2021:S0140-6736(21)02249-2. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02249-2.
12. Blain H, Tuailon E, Gamon L, et al. Receptor binding domain-IgG levels correlate with protection in residents facing SARS-CoV-2 B.1.1.7 outbreaks. *Allergy* 2021 doi: 10.1111/all.15142.
13. Infantino M, Pieri M, Nuccetelli M, et al. The WHO International Standard for COVID-19 serological tests: towards harmonization of anti-spike assays. *Int Immunopharmacol* 2021;100:108095.
14. Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021 doi: 10.1038/s41591-021-01540-1.
15. Padoan A, Cosma C, Bonfante F, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies after one or two doses of Comirnaty (BNT162b2, BioNTech/Pfizer): Kinetics and comparison with chemiluminescent assays. *Clin Chim Acta* 2021;523:446-53.
16. Jaganathan S, Stieber F, Rao SN, et al. Preliminary evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 total test in recently vaccinated individuals. *Infect Dis Ther* 2021;10:2765-76.
17. Tychala A, Meletis G, Katsimpourlia E, et al. Evaluation of the QuantiFERON SARS-CoV-2 assay to assess cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in individuals with low and high humoral response. *Hum Vaccin Immunother*. 2021 doi: 10.1080/21645515.2021.1991710.
18. Lippi G, Henry BM, Plebani M. Optimizing effectiveness of COVID-19 vaccination: will laboratory stewardship play a role? *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1885-8.
19. Lippi G, Henry BM, Plebani M. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies testing in recipients of COVID-19 vaccination: why, when, and How? *Diagnostics (Basel)* 2021;11:941.
20. Monto AS. The future of SARS-CoV-2 vaccination - lessons from influenza. *N Engl J Med* 2021;385:1825-7.

SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini

Parte I: Introduzione sulle tipologie dei vaccini e sui loro meccanismi di azione

Chiara Puricelli^{1,2}, Benedetta Carnaghi², Umberto Dianzani^{1,2}, Roberta Rolla^{1,2}

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

²Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

ABSTRACT

SARS-CoV-2 and the new era of vaccines

Part I: Introduction to the available vaccine platforms and their mechanism of action.

The introduction of vaccination programs aiming at inducing an active immune response against pathogens dates back to the first experimental approaches at the end of the 18th century and, since then, has represented a turning point in public health measures to contrast infections. The scientific improvements of the last few years in the field of molecular biology, immunology and genetic engineering have allowed to design new vaccines able to solve, at least in part, the hurdles of conventional vaccine platforms. From the first vaccines based on the inoculation of the whole microorganism, the scientific research has gone in the direction of platforms able to carry only a few or even a single antigenic component of the pathogen, ranging from subunit vaccines to those based on mRNA or DNA. This achievement has made vaccines easier and quicker to develop and, above all, much safer, and it has involved scientific fields that extend far beyond the attempt to fight infectious diseases, such as cancer research. The purpose of this review is to present an overview of the currently available vaccine platforms, their mechanism of action, and the advantages and pitfalls behind each approach.

Parole chiave: vaccini a DNA, vaccini a mRNA, SARS-CoV-2

INTRODUZIONE

L'immunologia moderna si è sviluppata dal successo ottenuto dal vaccino di Jenner contro il vaiolo alla fine del '700 e dal lavoro sistematico sviluppato circa un secolo dopo da Pasteur su numerosi agenti infettivi, partendo dal colera dei polli. Il più grande trionfo è stata l'eradicazione del vaiolo annunciata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1979 (1).

Le vaccinazioni rappresentano il principale strumento di sanità pubblica per la prevenzione ed il controllo delle malattie infettive e l'intervento medico a basso costo maggiormente efficace nel ridurre il carico di malattie infettive e morte nel mondo. Negli ultimi 100 anni l'aspettativa di vita è notevolmente aumentata, passando da una media di 40 anni ad una di 80 anni. Alla

base di questo cambiamento vi è indubbiamente il contributo dei vaccini (2). Essi, infatti, rappresentano una misura di prevenzione non solo per il singolo, ma per tutta la comunità, in quanto l'immunizzazione di un elevato numero di persone contro uno specifico agente patogeno (detta immunità di gregge) impedisce al microorganismo di trasmettersi, fino alla sua scomparsa definitiva, se l'unico ospite è l'uomo.

Le basi immunologiche della vaccinazione

Le prime linee di difesa contro le infezioni sono rappresentate da barriere fisiche e chimiche come le proteine antimicrobiche secrete a livello delle superfici delle mucose. I microrganismi che riescono a superare queste difese entrano in contatto con cellule e molecole

Corrispondenza a: Chiara Puricelli, Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara; Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara.
E-mail chiarap92@alice.it

Ricevuto: 26.07.2021

Revisionato: 10.09.2021

Accettato: 15.09.2021

Publicato on-line: 01.10.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.064

dell'ospite che organizzano una risposta immunitaria innata immediata. I macrofagi che si trovano nei tessuti, per esempio, riconoscono batteri e virus tramite recettori che legano molecole comuni a molti patogeni dette "spettri molecolari associati ai patogeni" (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP). Tra questi, i Toll-Like Receptors (TLR) costituiscono la famiglia più importante. Il legame a tali recettori stimola il macrofago a fagocitare e degradare il microrganismo e a secernere citochine e chemochine (citochine chemotattiche), che trasmettono importanti segnali ad altre cellule immunitarie, attivando in questo modo il processo di infiammazione. Tra le principali citochine che vengono rilasciate dai macrofagi, il fattore di necrosi tumorale (TNF- α), l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 6 (IL-6) contribuiscono alla difesa dell'ospite in vari modi, quali l'innalzamento della temperatura corporea: a temperature più elevate, infatti, la replicazione di virus e batteri è meno efficiente. Inoltre, le citochine hanno un ruolo fondamentale nel modulare la risposta di fase acuta a livello epatico che permette la produzione di numerose proteine difensive dell'immunità innata. Gli interferoni (INF- α e INF- β) sono invece proteine antivirali, che inducono resistenza alla replicazione virale in tutte le cellule e potenziano l'azione delle cellule Natural Killer (NK), che a loro volta attaccano quelle infettate da virus. L'infiammazione locale e la fagocitosi dei batteri, infine, vedono coinvolte anche le proteine del complemento (1).

Nella maggior parte dei casi, i meccanismi sopra descritti portano all'uccisione degli agenti patogeni ed al conseguente contenimento dell'invasione microbica. Tuttavia, quando questi meccanismi risultano insufficienti, entrano in gioco i linfociti, che avviano la risposta immunitaria adattativa o specifica. I linfociti B maturano nel midollo osseo e sono la fonte degli anticorpi circolanti. Essi riconoscono un'ampia varietà di antigeni grazie al legame con recettori proteici specializzati, le immunoglobuline (Ig), inizialmente espresse come recettori di membrana, ma in seguito prodotte in forma solubile dopo l'attivazione del linfocita e la sua differenziazione in plasmacellula. I linfociti T maturano nel timo e riconoscono gli antigeni, prevalentemente proteici, presentati dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) sulle cellule infettate o sulle cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells, APC), grazie al recettore dei linfociti T (T-Cell-Receptor, TCR). Le APC captano l'antigene e lo suddividono in piccoli peptidi di 10-20 aminoacidi (processazione dell'antigene). Ciascun peptide è quindi associato a una molecola MHC che è espressa sulla membrana della APC in modo da poter presentare il peptide al linfocita T (1).

L'attivazione del linfocita T richiede sempre che l'antigene sia riconosciuto in un contesto infiammatorio. Sono quindi necessari segnali co-stimolatori che, associati all'interazione tra il TCR e l'antigene, inducono l'attivazione del linfocita T e la sua differenziazione prevalentemente in linfocita T helper CD4+, in grado di

sostenere e potenziare l'attività dell'immunità innata e adattativa, e in linfocita T citotossico CD8+, che riconosce e uccide le cellule infettate. La via di co-stimolazione meglio caratterizzata coinvolge la molecola di membrana CD28, che lega le molecole B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) espresse dalle APC attivate nel corso dell'infiammazione. A loro volta i linfociti T attivati potranno trasmettere segnali co-stimolatori ai linfociti B permettendo la loro attivazione in seguito al riconoscimento dell'antigene tramite le Ig di membrana (1).

Una volta che l'agente infettivo è stato eliminato, una piccola popolazione di cellule specializzate, i linfociti di memoria, formati durante la risposta immunitaria adattativa, è in grado di persistere in assenza dell'antigene che li ha indotti in origine. La persistenza di queste popolazioni clonali di linfociti di memoria conferisce all'organismo la capacità di eliminare con estrema efficacia e rapidità una eventuale seconda infezione da parte dello stesso microrganismo patogeno. Questa protezione è una conseguenza della memoria immunologica ed è il meccanismo principale su cui si basa l'efficacia della vaccinazione. Lo scopo della vaccinazione è, infatti, la generazione di un'immunità contro un determinato patogeno che duri a lungo e sia protettiva grazie alla persistenza di un adeguato titolo anticorpale e alla produzione di cellule di memoria (1).

LA CLASSIFICAZIONE DEI VACCINI

In base alla tipologia della componente attiva, i vaccini possono essere classificati in tre gruppi principali: i vaccini tradizionali, costituiti da microrganismi interi, i vaccini costituiti da macromolecole purificate e i vaccini di nuova generazione. I vaccini costituiti da microrganismi interi possono contenere l'agente patogeno vivo attenuato, con ridotta patogenicità, oppure il microrganismo inattivato o ucciso.

Vaccini vivi attenuati

Sono generalmente prodotti da virus piuttosto che da batteri in quanto i virus contengono meno geni e l'attenuazione può essere controllata in modo più efficace (3). Solitamente, l'attenuazione del virus si ottiene facendolo crescere in colture di cellule non umane e, nel corso della selezione, la loro capacità di proliferare nelle cellule umane viene notevolmente ridotta. L'attenuazione può essere ottenuta più rapidamente con l'uso di tecniche del DNA ricombinante: se si può identificare un gene del virus necessario per la virulenza, ma non per la crescita o l'immunogenicità, questo gene può essere mutato ripetutamente o eliminato dal genoma. Poiché l'agente patogeno attenuato presenta gli stessi antigeni dell'agente patogeno originale, individui sani sviluppano risposte immunitarie paragonabili a quelle indotte dall'infezione naturale. Di conseguenza, questi vaccini inducono robuste risposte anticorpali e cellule-mediate e spesso conferiscono un'immunità a lungo termine dopo solo una o due dosi (3).

I vaccini attenuati presentano, tuttavia, alcune limitazioni. Una prima limitazione è il possibile sviluppo di retromutazioni che facciano riacquistare a questi ceppi la patogenicità. Inoltre la loro attenuazione può essere insufficiente per soggetti portatori di immunodeficienza, nei quali possono indurre infezioni simili a quelle del ceppo virulento (1).

Esempi di vaccini vivi attenuati attualmente autorizzati sono i vaccini contenenti i virus di morbillo, rosolia, parotite, varicella, febbre gialla, rotavirus, il vaccino antinfluenzale spray nasale, quello contenente il micobatterio della tubercolosi e il vaccino orale contro la poliomielite (Oral Polio Vaccine, OPV), sviluppato da Albert Sabin e ancora in uso in alcuni paesi in via di sviluppo (4-7).

Vaccini inattivati o uccisi

Vengono prodotti inattivando preparati di microrganismi interi usando perlopiù sostanze chimiche quali la formaldeide o altri agenti chelanti (3). Queste sostanze producono legami crociati tra le macromolecole, inattivando il patogeno ma senza alterare la sua struttura antigenica, in modo che il sistema immunitario possa comunque riconoscerlo ed eliminarlo. I vantaggi di questo approccio vaccinale rispetto a quello basato sull'attenuazione sono la stabilità e il sistema di conservazione. Tuttavia, questi vaccini possono essere meno efficaci in quanto inducono una risposta immunitaria di minore complessità e intensità.

Tra i vaccini inattivati ad oggi approvati, di particolare interesse sono quelli contenenti i virus di epatite A, il vaccino anti-poliomielite di Salk (Inactivated Polio Vaccine, IPV), il vaccino antinfluenzale definito "split" o "a virus frammentato" e il vaccino a cellule intere contro la pertosse, peraltro non più in uso da diversi anni e sostituito dal vaccino acellulare (4-6,8).

Vaccini costituiti da macromolecole purificate

Per la produzione di questi vaccini vengono utilizzate singole molecole del patogeno, quali tossoidi (o anatossine) e molecole di superficie. I vaccini ad anatossine/tossoidi sono costituiti da esotossine rilasciate dal microrganismo che svolgono un ruolo chiave nella sua patogenicità. Questa tipologia di vaccini viene realizzata detossificando la tossina mediante sostanze chimiche come la formaldeide. Le tossine inattivate non sono più patogene ma mantengono la capacità di indurre anticorpi neutralizzanti la tossina stessa (3). Esempi classici sono rappresentati dai vaccini contro la difterite e il tetano, la pertosse (acellulare), la meningite e il vaccino antinfluenzale definito "a subunità" (4). Gli antigeni purificati possono anche essere ottenuti con la tecnologia del DNA ricombinante, come nel caso del vaccino per l'epatite B.

L'espressione da parte di alcuni batteri di polisaccaridi di superficie con proprietà antigeniche, come nel caso di *Staphylococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*, ha

inoltre permesso di sviluppare vaccini contenenti queste macromolecole in grado di indurre una risposta immunitaria. Il loro principale svantaggio è il fatto che gli antigeni polisaccaridici inducono una risposta adattativa piuttosto debole, prevalentemente mediata da IgM e quindi indipendente dai linfociti T. Le conseguenze sono una più breve durata della protezione garantita dal vaccino e una minore efficacia nei bambini al di sotto dei due anni, il cui sistema immunitario è ancora in fase di maturazione, soprattutto per quanto riguarda le risposte anticorpali T-indipendenti. Per questo motivo sono stati sviluppati i vaccini coniugati, in cui un carrier proteico come i tossoidi di *Corynebacterium diphtheriae* o *Clostridium tetani* veicolano il polisaccaride, inducendo una risposta anticorpale T-dipendente e aumentando l'immunogenicità del vaccino. Esempi di questa tipologia sono i vaccini anti-meningococco C, l'anti-pneumococcico 13-valente e quello contro *Haemophilus influenzae* (3,9).

Tra le forme più moderne dei vaccini a macromolecole purificate si trovano i vaccini a subunità proteica ricombinante. In questi ultimi, porzioni di DNA che codificano per un determinato antigene del patogeno vengono inserite in una cellula, di solito batterica, di lievito, di insetto o di mammifero, permettendo l'espressione della molecola di interesse, che verrà in seguito purificata.

Nel caso di antigeni virali, questa tecnica consente anche di creare vere e proprie particelle simili a un virus (Virus-Like Particles, VLP), formate da un guscio di antigeni virali privo del genoma al suo interno. Le VLP vengono prodotte *in vitro* e assomigliano al virus, ma sono prive del materiale genetico virale, quindi sono sicure e permettono di indurre una buona risposta immunitaria (10). Questa tecnologia è stata sviluppata per i vaccini contro l'epatite B, contro il meningococco B e contro il papillomavirus umano (4,11).

La recente evoluzione di tecnologie d'avanguardia e delle discipline "omiche" ha permesso lo sviluppo della cosiddetta "reverse vaccinology" che, grazie al supporto della bioinformatica, consente l'identificazione *in silico* di regioni genomiche del patogeno che rappresentano potenziali antigeni per lo sviluppo di un vaccino. Questo approccio ha permesso di superare le difficoltà nella prevenzione dell'infezione da meningococco B, caratterizzato da un'ampia variabilità dei suoi antigeni polisaccaridici e dalla loro somiglianza ad alcuni antigeni umani, con il rischio di reazioni crociate e autoimmuni (3,12).

Vaccini ricombinanti vivi, polivalenti, a DNA nudo

Grazie alla disponibilità di tecnologie innovative, queste tipologie di vaccini sono state sviluppate per poter fronteggiare in tempi brevi gravi epidemie.

I vaccini ricombinanti vivi sono basati sull'utilizzo di un microrganismo (virus o batterio) che funge da vettore per far esprimere geni di un patogeno diverso. Vettori virali derivati da retrovirus, Virus Herpes Simplex,

Adenovirus o Poxvirus sono stati sviluppati per la vaccinazione contro un'ampia gamma di patogeni (3). I vaccini a DNA nudo si basano sulla possibilità di far produrre direttamente alle cellule dell'individuo gli antigeni contro i quali si vuole indurre una risposta immunitaria trattando il soggetto direttamente con plasmidi di espressione.

Vaccini a DNA o a RNA messaggero

La vaccinazione a DNA o a RNA messaggero (mRNA) induce prevalentemente la produzione di anticorpi ma può permettere anche lo sviluppo dell'immunità cellulare mediata da linfociti T citotossici. Le piattaforme a base di acidi nucleici sono risultate alternative estremamente promettenti agli approcci vaccinali convenzionali. I vaccini a DNA e i vaccini a mRNA, infatti, oltre ad essere in grado di innescare l'immunità umorale e quella cellulare, presentano una produzione potenzialmente rapida ed economica.

Vaccini a DNA

I vaccini a DNA sono stati sperimentati con successo in modelli animali fin dall'inizio degli anni '90 con l'obiettivo di prevenire e trattare non solo malattie infettive e cancro con una vaccinazione classica, ma anche malattie autoimmuni e allergiche con una vaccinazione "inversa" o "tollerogena", mirata a bloccare la risposta immunitaria patologica che causa queste malattie (13). Alcuni di essi sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso veterinario (14). Al momento non sono stati ancora approvati vaccini a DNA per l'utilizzo nell'uomo, tuttavia, con l'emergere della pandemia da SARS-CoV-2, diversi vaccini a DNA sono attualmente in fase di sperimentazione clinica.

Questa tipologia di vaccini è costituita da plasmidi ingegnerizzati in modo tale da trasportare geni che codificano per uno o più antigeni di un determinato agente infettivo. L'espressione del gene di interesse è controllata da un promotore, spesso derivante da virus come il Cytomegalovirus (CMV) o il virus SV40 che, in generale, sono in grado di determinare una elevata espressione genica (15). Una volta all'interno delle cellule bersaglio (miociti, cheratinociti o APC come le cellule dendritiche), il plasmide è trascritto e tradotto con produzione nel citoplasma di antigeni non-self, che vengono processati e presentati ai linfociti oppure rilasciati in forma secreta o associati a vescicole extracellulari, quali esosomi o corpi apoptotici (14). Oltre a questa risposta immunitaria cellulare, viene indotta una risposta immunitaria umorale in seguito al riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B tramite le Ig di membrana e alla co-stimolazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper CD4+ (Figura 1). I vaccini a DNA sono potenzialmente in grado di fornire un'immunità contemporaneamente contro patogeni differenti, in quanto i plasmidi possono essere ingegnerizzati in modo tale da trasportare geni codificanti antigeni appartenenti a ceppi diversi di uno

stesso patogeno (15).

La semplice produzione dei plasmidi offre a questi vaccini numerosi vantaggi rispetto ai vaccini convenzionali costituiti da microrganismi interi o da proteine. Innanzitutto, dal punto di vista della sicurezza, l'amplificazione degli acidi nucleici evita la necessità di manipolare direttamente agenti patogeni pericolosi. Inoltre il DNA plasmidico è stabile a temperatura ambiente e questo ne consente una facile conservazione. Infine, questi vaccini non comportano alcun rischio di reversione della patogenicità e la loro produzione industriale è relativamente poco costosa. D'altra parte, però, presentano due problematiche rilevanti. Da un lato non è possibile controllare la durata di espressione del plasmide, che può durare settimane o mesi, con il rischio teorico che la risposta vaccinale induca danni nel tessuto che viene a esprimere gli antigeni vaccinali e possibilmente anche malattie autoimmuni. Dall'altro lato esiste il rischio che il plasmide si integri nel DNA della cellula ospite causando mutazioni con conseguenze anche gravi, come descritto in alcuni casi di terapia genica nel passato (16,17). Questi rischi potenziali hanno frenato fino a oggi l'uso di questi vaccini nell'uomo, nonostante i positivi risultati ottenuti nell'animale, e hanno invece promosso lo sviluppo dei vaccini a mRNA.

Vaccini a mRNA

Sebbene i vaccini a mRNA siano stati testati per la prima volta all'inizio degli anni '90, il loro studio è rimasto in un primo momento limitato a causa delle preoccupazioni riguardanti la scarsa stabilità della molecola. Nel 1995 Ross et al. hanno dimostrato che la stabilità dell'mRNA poteva essere potenziata e migliorata (18). Da allora, gli studi su questa tipologia di vaccinazione si sono moltiplicati esponenzialmente. Negli ultimi anni, infatti, importanti investimenti tecnologici e di ricerca hanno permesso all'mRNA di diventare un promettente strumento terapeutico e di profilassi. Prima di dicembre 2020, nessun vaccino a base di mRNA era stato approvato per l'uso sull'essere umano, nonostante molti fossero gli studi clinici in corso, soprattutto in ambito oncologico (19). La pandemia di COVID-19 ha però stimolato la ricerca in questo campo, accelerando notevolmente le tempistiche dei tradizionali iter di sviluppo di un vaccino.

L'mRNA è una molecola a singolo filamento deputata a trasferire le informazioni genetiche, tramite il processo di trascrizione, dal DNA nucleare al citoplasma, dove verranno tradotte grazie ai ribosomi portando alla sintesi di proteine. È possibile classificare i vaccini a mRNA in due principali categorie: i vaccini a mRNA convenzionali e i vaccini a mRNA auto-amplificante (self-amplifying mRNA, SAM). Entrambi utilizzano il meccanismo di traduzione della cellula ospite per produrre l'antigene di interesse e innescare così una risposta immunitaria.

I vaccini a mRNA convenzionali sono costituiti da una molecola di mRNA non replicante (non-replicating mRNA, NMR), concettualmente simile alle molecole di

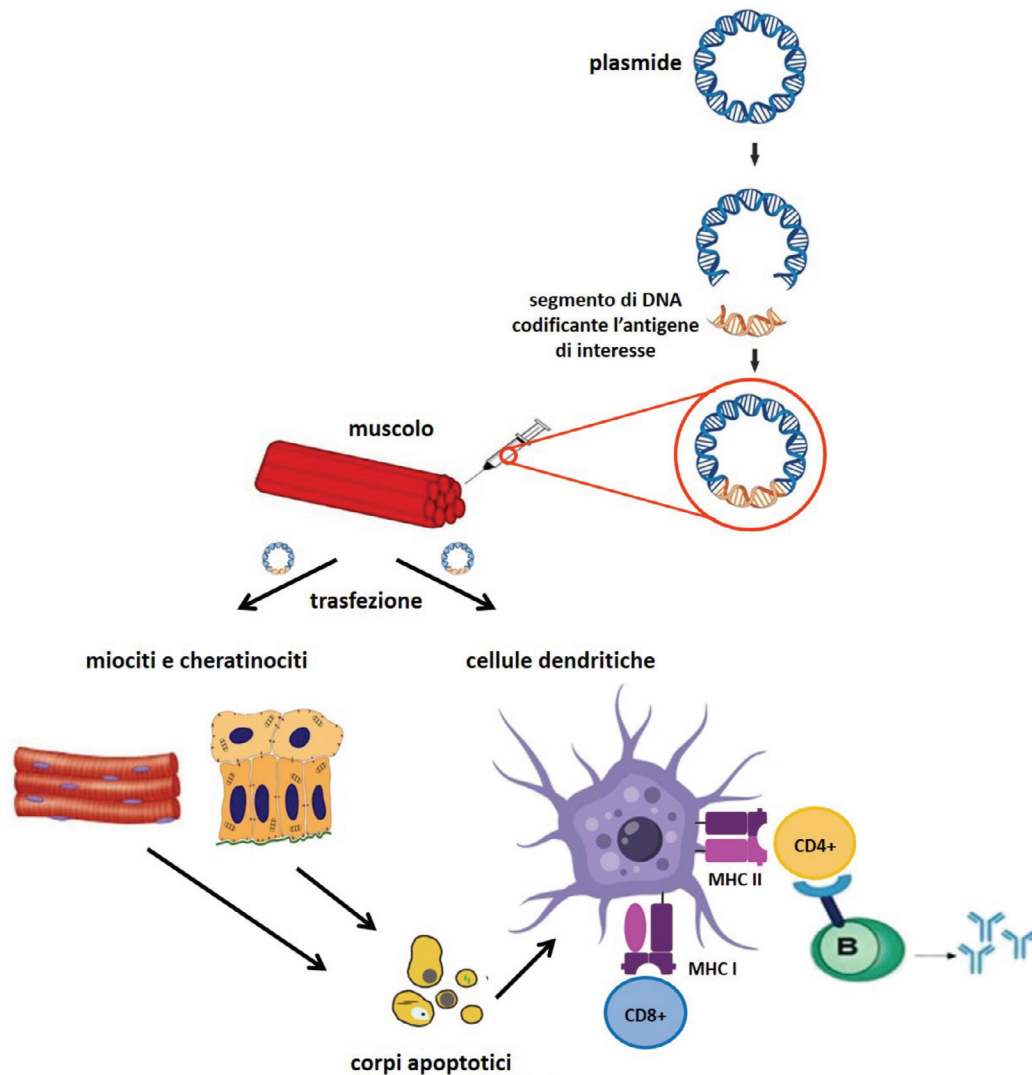


Figura 1

Meccanismo di azione dei vaccini a DNA.

Il segmento di DNA codificante l'antigene di interesse viene inserito all'interno di un plasmide che, dopo l'iniezione intramuscolare del vaccino, penetra nelle cellule (miociti, cheratinociti, cellule dendritiche) e, sfruttando il loro processo di trascrizione, porta alla sintesi della proteina antigenica da parte delle cellule stesse. Le cellule dendritiche processano ulteriormente la proteina e la presentano infine alle cellule dell'immunità adattativa come i linfociti T CD4+ e CD8+, stimolando una risposta umorale e cellulo-mediata. Gli antigeni espressi a partire dal plasmide possono raggiungere le cellule dendritiche anche indirettamente, attraverso corpi apoptotici o vescicole extracellulari rilasciati dalle altre cellule trasfettate.

CD, cluster di differenziazione; DNA, acido desossiribonucleico; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità.

mRNA della cellula ospite, che codifica solo per l'antigene di interesse. I vaccini a mRNA auto-amplificante, invece, contengono un costrutto che codifica non solo per l'antigene, ma anche per componenti replicative aggiuntive in grado di dirigere l'amplificazione dell'mRNA intracellulare (19,20). I vaccini costituiti da mRNA auto-amplificante esprimono livelli più elevati di proteine e persistono più a lungo rispetto all'mRNA non replicante (10). Possono essere sviluppati e prodotti in tempi rapidi e con costi limitati, soprattutto grazie alle elevate rese delle reazioni di

trascrizione *in vitro* (IVT).

Il meccanismo d'azione di questi vaccini è molto simile a quello dei vaccini a DNA, ma, rispetto a quest'ultimo, non comporta alcun rischio di integrazione nel genoma dell'ospite. Infatti, la molecola di mRNA viene tradotta direttamente nel citoplasma delle cellule e successivamente viene degradata per cui l'espressione dell'antigene è transitoria. Questa caratteristica riduce i possibili danni, immunologici e non, dovuti ad un'espressione protratta dell'antigene o degli adiuvanti e permette di evitare un'eccessiva stimolazione dei linfociti che potrebbe addirittura inibire la risposta immunitaria

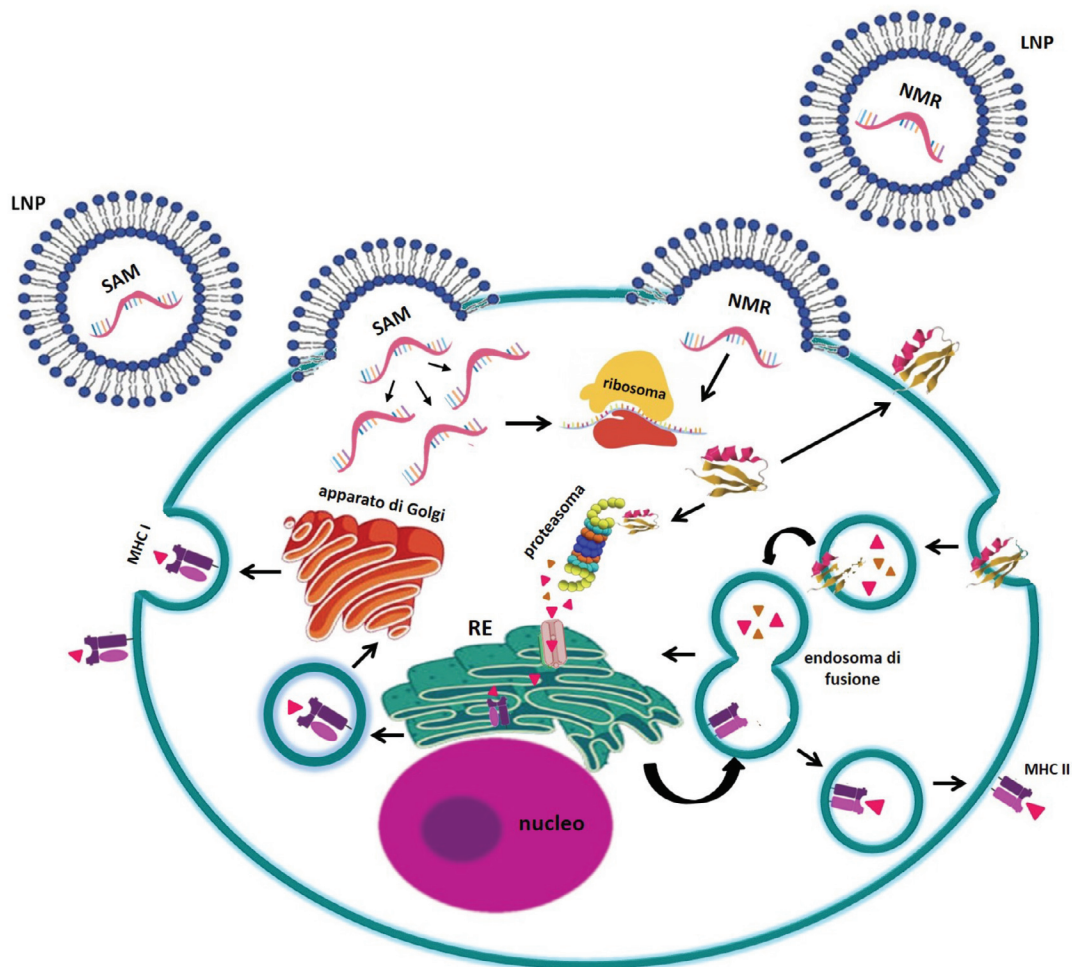


Figura 2

Meccanismo di azione dei vaccini a mRNA.

Rappresentazione delle due principali categorie di mRNA utilizzate nello sviluppo dei vaccini: l'mRNA non replicante e l'mRNA auto-amplificante. In questa figura le molecole di mRNA vengono somministrate complessate con nanoparticelle lipidiche. Dopo la fusione con la membrana plasmatica, l'mRNA viene rilasciato all'interno della cellula. Il SAM va incontro ad auto-amplificazione prima di interagire con i ribosomi e con l'RNA di trasferimento, mentre il NMR sfrutta direttamente il sistema di trascrizione della cellula. In seguito alla sintesi della proteina, questa verrà ulteriormente processata per essere infine esposta sulla superficie cellulare attraverso i complessi maggiori di istocompatibilità (MHC I e MHC II) per la presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario.

LNP, nano particella lipidica; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità; mRNA, RNA messaggero; NMR, mRNA non replicante; RE, reticolo endoplasmatico; SAM, mRNA auto-amplificante.

(21) (Figura 2).

Per una migliore efficacia vaccinale, è spesso richiesto un sistema che veicoli nel tessuto la molecola di mRNA in maniera ottimale. I trasportatori a base di lipidi o polimeri, ad esempio, permettono di migliorare la captazione cellulare della molecola di RNA. In particolare, la metodologia più utilizzata nello sviluppo di vaccini a mRNA è basata sull'utilizzo di nanoparticelle lipidiche (LNP). Le LNP sono minuscole sfere lipidiche, di circa 100 nm, che possono incapsulare le molecole di RNA proteggendole dalla degradazione enzimatica e

favorendo la loro veicolazione nel citosol cellulare. Solitamente le LNP sono costituite da quattro componenti: un lipide cationico ionizzabile, che promuove l'autoassemblaggio in particelle delle dimensioni di un virus e consente il rilascio endosomiale dell'mRNA, polietilenglicole (PEG), che aumenta l'emivita della formulazione, colesterolo, come agente stabilizzante, e fosfolipidi. L'entità e la durata della produzione di proteine, innescata dai vaccini mRNA che utilizzano LNP, possono essere controllate variando la via di somministrazione del vaccino. È stato dimostrato

che l'iniezione intramuscolare e quella intradermica di mRNA-LNP assicurano un'espressione proteica più consistente rispetto alla somministrazione endovenosa (19).

Infine la maggior parte dei vaccini a mRNA richiede una rigorosa gestione della catena del freddo per quanto riguarda la loro conservazione ed il loro trasporto. Questa caratteristica rappresenta un ostacolo soprattutto nei paesi a scarso sviluppo tecnologico. A tal proposito, l'ottimizzazione della formulazione di vaccini a mRNA ha portato alla formulazione di vaccini termostabili. Un esempio è stato riportato da uno studio di Jones et al., in cui veniva utilizzata una formulazione liofilizzata con trealosio: l'mRNA così trattato è risultato stabile per almeno 10 mesi alla temperatura di 4 °C e in grado di indurre la produzione di alti livelli di proteine e l'innescare di un'immunità altamente efficace e di lunga durata (22).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science, 8^a ed. 2011.
2. Rappuoli R, Santoni A, Mantovani A. Vaccines: an achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. *J Exp Med* 2019;216:7-9.
3. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med* 2018;50:110-120.
4. Agenzia Italiana del Farmaco, <https://www.aifa.gov.it/> (ultimo accesso: giugno 2021).
5. GPEI-Global Polio Eradication Initiative, <https://polioeradication.org/> (ultimo accesso: giugno 2021).
6. World Health Organization. Polio vaccines: WHO position paper – March, 2016. *Wkly Epidemiol Rec* 2016;12:145-68.
7. CDC, Live Attenuated Influenza Vaccine LAIV. The Nasal Spray Flu Vaccine. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/nasalspray.htm> (ultimo accesso: giugno 2021).
8. Fanget N. Pertussis: a tale of two vaccines. *Nature Milestones in vaccines*. Nature Publishing Group. 2020:S12.
9. Zuccotti GV. *Manuale di Pediatria - La Pratica Clinica*. Bologna: Esculapio. 2^a ed. 2016.
10. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol* 2020;202:162-92.
11. Cheng L, Wang Y, Du J. Human papillomavirus vaccines: An updated review. *Vaccines* 2020;8:1-15.
12. Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: A decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect* 2012;8:109-16.
13. Cappellano G, Comi C, Chiocchetti A, et al. Exploiting PLGA-Based Biocompatible Nanoparticles for Next-Generation Tolerogenic Vaccines against Autoimmune Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20:204-19.
14. Hobernik D, Bros M. DNA vaccines - How far from clinical use? *Int J Mol Sci*. 2018;19:3605.
15. Lee J, Arun Kumar S, Jhan YY, et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater* 2018;80:31-47.
16. Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines* 2014;2:624-41.
17. Myhr AI. DNA vaccines: Regulatory considerations and safety aspects. *Curr Issues Mol Biol* 2017;2:79-88.
18. Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 1995;59:423-50.
19. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:261-79.
20. Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, et al. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines* 2020;5:1-6.
21. Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2017;16:871-81.
22. Jones KL, Drane D, Gowans EJ. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* 2007;43:675-81.

SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini

Parte II: I vaccini oggi in uso per contrastare la pandemia da COVID-19 e il ruolo del laboratorio nella campagna vaccinale

Chiara Puricelli^{1,2}, Benedetta Carnaghi², Umberto Dianzani^{1,2}, Roberta Rolla^{1,2}

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

²Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

ABSTRACT

SARS-CoV-2 and the new era of vaccines – Part II

Currently available vaccines to fight the COVID-19 pandemic and the laboratory role in the vaccination campaign.

The COVID-19 pandemic has prompted an unprecedented race to find the means to contrast the SARS-CoV-2 infection, resulting in a huge common effort to develop an efficacious vaccine as soon as possible and an exceptional acceleration of the review process to ensure its safety and efficacy. Many technological platforms are currently under investigation or have already been approved, including those based on the inactivated virus, mRNA- or DNA-based vaccines expressing viral antigens, recombinant SARS-CoV-2 proteins and vector-based vaccines exploiting chimeric adenoviruses. The emergence of new viral variants has represented an additional challenge and has induced the entire scientific community to potentiate the monitoring process of the ongoing vaccination campaigns. In this scenario, laboratory medicine certainly plays a pivotal role not only in the diagnosis of the infection but also in monitoring the immune response to vaccines and in the detection and prevention of clinically significant adverse events, ultimately contributing to the determination of the biological and clinical efficacy of the available vaccines. This review offers an overview of the most recent and updated data on anti-SARS-CoV-2 vaccines and the technological principles behind them as well as on the resources that laboratory medicine can offer to support the vaccination campaigns. All these aspects represent a rapid step forward in the clinical field which transcends the COVID-19 outbreak and that will certainly pave the way for the future scientific research.

Parole chiave: SARS-CoV-2, vaccini a DNA, vaccini a mRNA

I PROGRESSI E LE INSIDIE NELLA RICERCA DI VACCINI EFFICACI PER SARS-CoV-2

I primi casi di COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), la malattia infettiva causata dal SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), sono stati riscontrati nel novembre del 2019 a Wuhan, in Cina. Il virus si è diffuso rapidamente in tutto il mondo e l'11 marzo 2020 l'OMS ha dichiarato formalmente la pandemia globale. Il 10 gennaio 2020, 54 giorni dopo il primo caso dichiarato, è stata pubblicata l'intera sequenza del genoma del virus SARS-CoV-2 (1). Da quel momento, scienziati e organizzazioni di tutto il mondo hanno collaborato per contrastare la diffusione del contagio e sviluppare il prima possibile dei vaccini

efficaci e sicuri contro il virus. Attualmente, sono più di 200 i vaccini in corso di sviluppo; sono stati preparati seguendo diverse strategie tecnologiche, una diversificazione necessaria di fronte a una nuova malattia come COVID-19, in quanto, sulla base delle conoscenze attuali, è ancora difficile prevedere quale vaccino risulterà il più efficace. Ad oggi (agosto 2021) sono stati autorizzati dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), in Europa, quattro vaccini: due vaccini a mRNA, Pfizer mRNA BNT162b2 (Comirnaty) e COVID-19 Vaccine Moderna mRNA-1273 (Spikevax), e due vaccini che utilizzano adenovirus ricombinanti come vettore di antigeni di SARS-CoV2, Vaxzevria (COVID-19 Vaccine AstraZeneca) e COVID-19 Vaccine Janssen Ad26.COV2-S (2, 3) (Tabella 1).

Corrispondenza a: Chiara Puricelli, Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara; Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara, E-mail chiarap92@alice.it

Ricevuto: 26.07.2021

Revisionato: 10.09.2021

Accettato: 17.09.2021

Pubblicato on-line: 07.10.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.065

Tabella 1
Caratteristiche dei vaccini anti SARS-CoV-2 approvati in almeno un Paese del mondo (dati aggiornati ad agosto 2021)

Nomi (riferimenti bibliografici)	Produttori	Paese di origine	Contenuto	Target	Posologia	Stabilità ^a	Efficacia % ^b (95% IC)	Costo
Vaccini a mRNA								
Comirnaty; Pfizer mRNA BNT-162b2; Tozinameran (4,5)	Pfizer; Biontech; Fosun Pharma	Multi-nazionale	Nanoparticella lipidica contenente mRNA modificato a livello dei nucleosidi e codificante la proteina Spike intera con due mutazioni puntiformi che la stabilizzano in conformazione di pre-fusione	Spike	2 dosi IM da 0,3 mL (30 µg) a distanza di 3 settimane	Da -90 °C a -60 °C: 6 mesi Da -25 °C a -15 °C: 2 settimane 2-8 °C: 30 giorni 8-30 °C: 4 ore 2-30 °C dopo diluizione: 6 ore	95,0 (90,0; 97,9) ^d	14,70-19,50 \$
Moderna COVID-19 Vaccine (mRNA-1273); Spikevax; TAK-919 (in Giappone) (4,6)	Moderna e U.S. National Institute of Health/ Takeda	Stati Uniti/ Giappone	Nanoparticella lipidica contenente mRNA codificante la proteina Spike intera modificata tramite 2 sostituzioni prolinciche all'interno del dominio di ripetizione a sette peptidi (S-2P) per stabilizzarla in conformazione di pre-fusione	Spike	2 dosi IM da 0,5 mL (100 µg) a distanza di 28 giorni	Da -25 °C a -15 °C: 7 mesi 2-8 °C: 30 giorni 8-25 °C: 24 ore	94,1 (89,3, 96,8) ^e	25-37 \$
Vaccini a DNA								
ZyCoV-D (7-10)	Zydus Cadila Healthcare	India	Vettore plasmidico pVAX1 (da coltura di <i>Escherichia coli</i> DH5-alpha) contenente DNA codificante Spike e un peptide di segnale IgE	Spike	3 dosi intradermiche da 0,2 mL (2 mg) a distanza di 28 giorni con dispositivo needle-free Pharmajet®	2-8 °C ma stabile a temperatura ambiente (25 °C) fino a 3 mesi	66,6 (Dati non sottoposti a peer-review)	Non noto
Vaccini a vettore virale								
Sputnik V; Gam-Covid-Vac (4, 53)	Gamaleya Research Institute; Acellena Contract Drug Research and Development	Russia	Due vettori adenovirali umani ricombinanti (rAd26 per la prima dose e rAd5 per la seconda dose) codificanti Spike	Spike	2 dosi IM (ciascuna contenente 1011 particelle virali) a distanza di 3 settimane ^e	20 °C In corso di sviluppo una formulazione conservabile a 2-8 °C	91,1 (83,8-95,1) ^d	<10 \$
Vaxzevria; COVID-19 Vaccine AstraZeneca; ChAdOx1 n-CoV-19; AZD1222; Covishield (in India) (4, 11)	AstraZeneca/Università di Oxford/ Biomedical Advanced Research and Development Authority (BARDA); Operation Warp Speed (OWS)	Regno Unito	Adenovirus di scimpanzé ChAdOx1-S codificante Spike prodotto in cellule renali embrionali umane geneticamente modificate (HEK) 293 mediante tecnologia del DNA ricombinante	Spike	2 iniezioni IM da 0,5 mL (2,5 x 108 unità infettive) a distanza di 4-12 settimane In fase di studio una formulazione inalabile	2-8 °C: 6 mesi 8-30 °C: 12 ore	59,5 (45,8, 69,7) ^e	2-10 \$

Tabella 1
Continua...

Nomi (riferimenti bibliografici)	Produttori	Paese di origine	Contenuto	Target	Posologia	Stabilità ^a	Efficacia % ^b (95% IC)	Costo
Convidecia; Ad5-nCoV (4, 12)	CanSino Biologics; Beijing Institute of Biotechnology	Cina	Vettore adenovirale umano tipo 5 Spike (Ad5) codificante la glicoproteina Spike intera	5 Spike	Singola dose IM da 0,5 mL (5X10 ¹⁰ particelle virali)	2-8 °C	65,37 ^b COVID-19 severa: 90,07 ^a	<4 \$
COVID-19 Vaccine Janssen Ad26.COV2.S (4, 13, 55)	Janssen/Johnson & Johnson	Stati Uniti	Adenovirus umano 26 codificante Spike intera e stabilizzata, prodotto nella linea cellulare PER.C6 TetR mediante tecnologia del DNA ricombinante	Spike	Singola dose IM da 0,5 mL (8,92 log ₁₀ unità infettive)	Da -25 °C a -15 °C: 2 anni 2-8 °C: 3 mesi	66,1 (55,01; 74,80) ^b COVID-19 severa: 85,4 (54, 15; 96,90) ^b	2,80-9 \$
Vaccini a subunità proteica								
EpiVacCorona (4, 13, 14)	Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology (BEKTOP, Vector)	Russia	Glicoproteina Spike sintetica, coniugata con proteina carrier e adsorbita su adiuvante (idrossido di alluminio)	Spike	2 dosi IM da 0,5 mL a distanza di 21 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto
ZF2001/RBD Dimer (4, 15)	Anhui Zhifei Longcom/ Accademia delle Scienze Cinese	Cina	Dimero di RBD (Receptor Binding Domain) di Spike prodotto con tecnologia a DNA ricombinante in cellule di ovaio di criceto cinese (Chinese Hamster Ovary cells) abbinato ad adiuvante (idrossido di alluminio)	RBD di Spike	3 dosi IM da 0,5 mL (25µg) a distanza di 30 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto
Abdala (CIGB-66) (16)	Center for Genetic Engineering and Biotechnology	Cuba	Subunità proteica (Spike) ricombinante ottenuta da coltura di cellule di lievito con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	RBD di Spike	3 dosi IM da 0,5 mL a distanza di 14 o 28 giorni	Dati non disponibili	92,28	Non noto
MVC-COV1901 (17)	Medigen Vaccine Biologicals Corporation	Taiwan	Proteina Spike intera modificata tramite 2 sostituzioni prolinciche (S-2P) stabilizzata in conformazione pre-fusione con aggiunta di adiuvante (CpG e idrossido di alluminio)	Spike	2 dosi IM (15 µg) a distanza di 28 giorni	2-8 °C	99,8 (99,20, 99,97) ^b	Non noto
Vaccini a virus inattivato								
BBIBP-CorV (4, 18-22)	Beijing Institute of Biological Products; China National Pharmaceutical Group (Sinopharm)	Cina	SARS-CoV-2 coltivato in cellule VERO e inattivato con β-propiolattone, con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (4 µg) a distanza di 21-28 giorni	2-8 °C	78,1 (64,9, 86,3)	30-72,50 \$

Tabella 1
Continua...

Nomi (riferimenti bibliografici)	Produttori	Paese di origine	Contenuto	Target	Posologia	Stabilità ^a	Efficacia % (95% IC) ^b	Costo
Vaccini a virus inattivato								
CoronaVac; PicoVacc (4,13,23,24)	SinoVac Research and Development	Cina	SARS-CoV-2 inattivato con adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (3 µg) a distanza di 2-4 settimane	2-8 °C: almeno 6 mesi	50,38-91,25 (dati variabili sulla base di diversi studi epidemiologici)	≈ 30 \$
Inactivated SARS-CoV-2 vaccine (4,25,26)	SinoPharm/Wuhan Institute of Biological Products	Cina	SARS-CoV-2 coltivato in cellule VERO inattivato con β-propionlattone, con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (5 µg) a distanza di 21-28 giorni	2-8 °C	72,8 (58,1-82,4)	30-72,50 \$
Covaxin: BBV152 A, B, C (4,13,26,27)	Bharat Biotech/Indian Council of Medical Research/Indian National Institute of Virology	India	SARS-CoV-2 inattivato	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM a distanza di 4 settimane	Stabile a temperatura ambiente per una settimana	COVID-19 asintomatica: 63,6 (29,0-82,4) ^c COVID-19 sintomatica: 77,8 (65,2-86,4) ^c	2-3 \$
QazVac (4,28,29)	Kazakhstan Research Institute for Biological Safety Problems	Kazakistan	SARS-CoV-2 inattivato	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL a distanza di 21 giorni	2-8 °C	COVID-19 severa: 93,4 (57,1-99,8) ^c	Non noto
SARS-CoV-2 Vaccine; KCONVAC (4,30,31)	Shenzhen Kangtai Biological Products/Beijing Minhai Biotechnology	Cina	Virus inattivato	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (5 µg) a distanza di 28 giorni	Non nota	Dati non ancora disponibili	Non noto
COVID-19 Inactivated Vaccine (4,32)	Shifa Pharmmed	Iran	SARS-CoV-2 inattivato coltivato in cellule VERO	Virione SARS-CoV-2	2 dosi da 5 µg IM a distanza di 28 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto
KoviVac (4,33)	Chumakov Center (Russian Academy of Sciences) (Russia)	Russia	SARS-CoV-2 coltivato in cellule VERO e inattivato con β-propionlattone, con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (3 µg) a distanza di 14 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto

^aLe indicazioni sulla stabilità si riferiscono al prodotto prima dell'apertura
^bL'efficacia si riferisce alla prevenzione dello sviluppo di malattia
^cFormulazione non pronta all'uso iniettabile dopo diluizione in soluzione salina allo 0,9%
^dEfficacia misurata a 7 giorni dall'ultima dose in soggetti sieronegativi prima della vaccinazione
^eEfficacia misurata a 14 giorni dall'ultima dose in soggetti sieronegativi prima della vaccinazione
^fE' stata approvata anche una formulazione a singola dose. Sputnik-Light
^gEfficacia misurata a 28 giorni dall'ultima dose in soggetti sieronegativi prima della vaccinazione IM, intramuscolo.

Il piano strategico di vaccinazione in Europa si è concentrato sulla riduzione dei casi gravi e dei decessi e sul mantenimento dei servizi essenziali più critici. I primi ad aver ricevuto il vaccino sono stati, pertanto, il personale sanitario, particolarmente a rischio in quanto maggiormente esposto, le persone anziane e i soggetti più fragili affetti da patologie croniche. Con l'aumentare della disponibilità dei vaccini, le strategie di vaccinazione e i loro obiettivi sono stati adeguati di conseguenza. Inoltre, trattandosi di un'emergenza sanitaria che interessa il mondo intero, la capacità di produzione del vaccino dovrebbe garantire un'equa distribuzione a livello globale. A tal proposito, alcune organizzazioni, come Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI), The Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) hanno istituito il COVID-19 Vaccines Global Access (COVAX), un meccanismo globale di condivisione del rischio per l'approvvigionamento in comune e la distribuzione equa di vaccini contro SARS-CoV-2 (34).

Virologia di SARS-CoV-2

I coronavirus (CoV) sono virus appartenenti alla famiglia dei *Coronaviridae* e possono causare malattie a diverso spettro sintomatico, che vanno dal comune raffreddore a sindromi respiratorie gravi come la Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) e la Middle East Respiratory Syndrome (MERS), registrate per la prima volta rispettivamente nel 2002 e nel 2012. SARS-CoV-1, MERS-CoV e SARS-CoV-2, responsabili rispettivamente di SARS, MERS e COVID-19, appartengono allo stesso genere, i *Betacoronavirus* (35).

COVID-19 è caratterizzata da tre principali stadi: asintomatico, sintomatico non grave e sintomatico con sindrome respiratoria acuta. In circa l'80% dei pazienti, SARS-CoV-2 causa sintomi simil-influenzali quali febbre, affaticamento, dolori muscolari, brividi, perdita di appetito, tosse persistente, anosmia e ageusia. Nei casi più gravi, la malattia è caratterizzata da collasso cardiocircolatorio, sindrome iperinfiammatoria associata ad una eccessiva produzione di citochine infiammatorie, tra cui IL-6, IL-1, IFN- γ e TNF- α , disturbi della coagulazione con microtrombosi polmonare e danno multi organo (36).

Il genoma dei coronavirus è costituito da un singolo filamento di RNA (ssRNA) a polarità positiva e di grande taglia (27-32 kb); non sono noti virus a RNA di taglia maggiore. I coronavirus hanno un diametro di 100-150 nm, sono pleiomorfi e rivestiti da un involucro lipidico, l'envelope. Il genoma di SARS-CoV-2 codifica per 11 ORF (open reading frames), molte delle quali hanno ancora funzioni sconosciute. ORF1a e ORF1b codificano per 16 proteine non strutturali ampiamente conservate nei coronavirus. Altri 4 geni codificano per le principali proteine strutturali: ORF4 codifica per la proteina dell'envelope (E), ORF5 per la proteina di membrana (M), ORF9 per la proteina del nucleocapside (N) e ORF2 per la glicoproteina di superficie Spike (S).

Gli altri geni codificano per proteine accessorie (Figura 1) (1,35).

Gli aggregati trimerici della proteina Spike, che sporgono dalla superficie del virione, hanno il ruolo essenziale di permettere l'aggancio, la fusione e l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule umane. La regione della proteina Spike che interagisce con il recettore sulla cellula ospite è chiamata Receptor Binding Domain (RBD) ed è localizzata a livello del dominio S1b. Nello specifico, il RBD lega l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2), un ectoenzima espresso sulla superficie di cellule dei polmoni, delle arterie, del cuore, dell'intestino, dei reni e del sistema nervoso (37,38). L'ACE2 è uno degli enzimi centrali nel sistema renina-angiotensina (RAS) che regola la pressione arteriosa, l'equilibrio idro-elettrolitico e le resistenze vascolari sistemiche e catalizza la conversione dell'angiotensina II ad angiotensina 1-7. L'infezione da SARS-CoV-2 riduce l'espressione dell'ACE2, con aumento di angiotensina II e ha importanti effetti pro-infiammatori, particolarmente a livello polmonare (Figura 2) (39,40). È stato osservato che SARS-CoV-2 ha un'affinità 10-20 volte maggiore per ACE2 rispetto a SARS-CoV-1 (41). Una volta avvenuto il legame, la proteina Spike viene scissa da proteinasi di superficie, quali la furina o TMPRSS2 (Transmembrane Serine Protease 2), che liberano così gli "artigli di fusione" della proteina, consentendo la fusione con la membrana della cellula ospite (Figura 1). L'RNA viene quindi rilasciato nel citoplasma, replicato per opera di una RNA polimerasi RNA-dipendente e tradotto per la formazione di nuove particelle virali. Per questo motivo la proteina Spike e i suoi frammenti rappresentano il determinante antigenico chiave per lo sviluppo dei vaccini anti-COVID-19 (1).

La risposta immunitaria al SARS-CoV-2

Sia l'immunità innata sia quella adattativa svolgono un ruolo fondamentale durante l'infezione da SARS-CoV-2. Il sistema immunitario innato è in grado di limitare l'aggressività del coronavirus, soprattutto a livello delle vie aeree superiori, dove il contagio avviene prevalentemente tramite inalazione di goccioline di saliva (droplets) emesse da un soggetto infetto. Un potenziale meccanismo con cui agisce la risposta immunitaria innata è rappresentato dalla produzione di interferoni di tipo I (INF-1), citochine che riducono la replicazione virale. A differenza di altri coronavirus, però, il SARS-CoV-2 non stimola il rilascio di grandi quantità di INF-1. Inoltre, le evidenze sul ruolo di queste citochine sono ancora scarse (42). Anche le immunoglobuline naturali, ovvero quelle presenti dalla nascita, potrebbero avere un ruolo protettivo. È interessante notare come le IgM naturali subiscano una drastica riduzione con il progredire dell'età, fenomeno che potrebbe spiegare perché la forma grave della malattia colpisce maggiormente la popolazione anziana.

Per quanto riguarda la risposta immunitaria adattativa, l'infezione con decorso lieve è associata ad

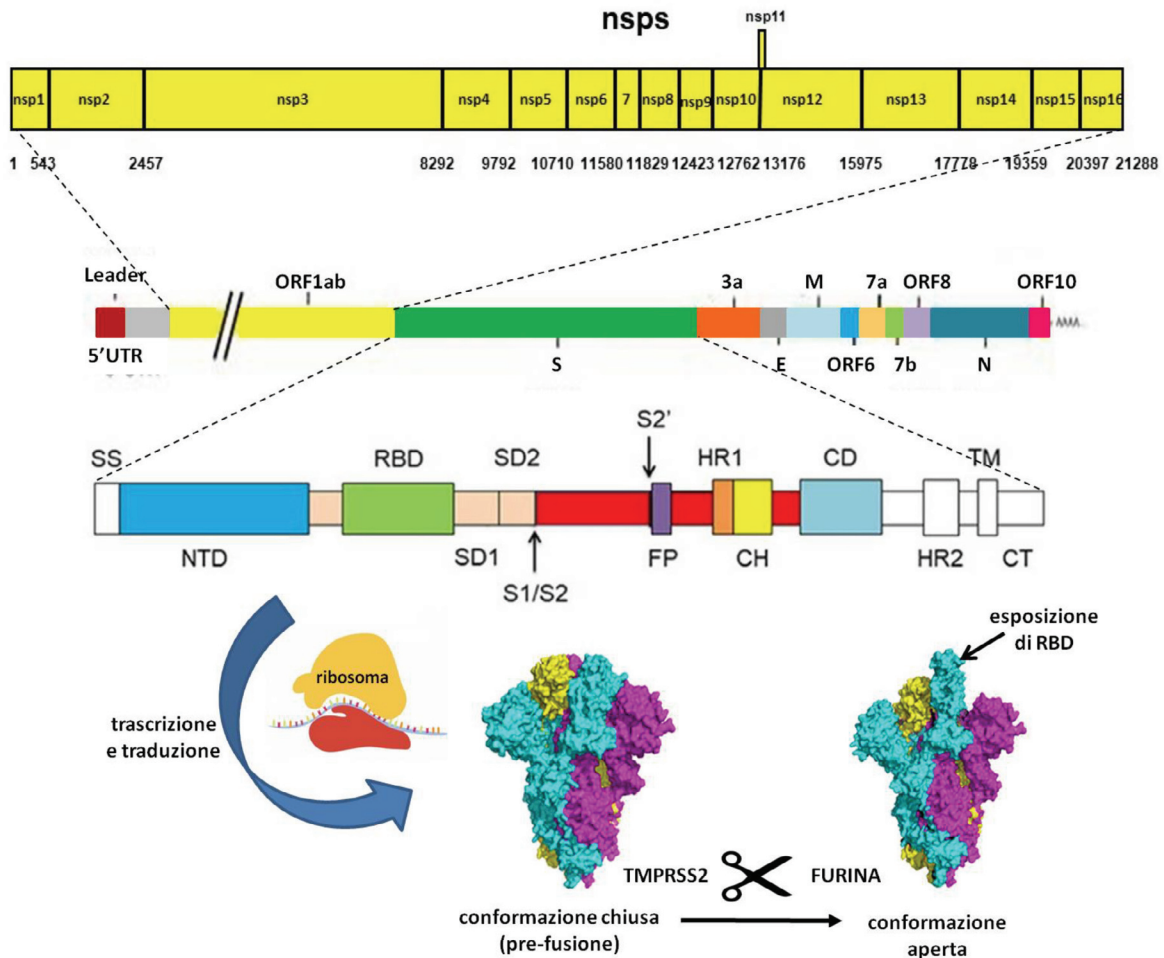


Figura 1

Rappresentazione grafica del genoma di SARS-CoV-2 e della proteina Spike.

Il genoma di SARS-CoV-2, a base di RNA a singolo filamento, è costituito da diversi segmenti, ognuno codificante specifiche proteine strutturali e non strutturali. Il principale ruolo antigenico è rivestito dalla glicoproteina di superficie Spike, il cui gene è rappresentato nella parte inferiore dell'immagine. La sua struttura trimerica può assumere due conformazioni principali, chiusa, o pre-fusione, e, dopo clivaggio per mezzo delle proteasi furina o TMPRSS2, aperta, con esposizione del RBD per l'ancoraggio ad ACE2.

CD, dominio di connessione; FP, peptide di fusione; HR, ripetitività di sette residui; ORF, sequenza di inizio lettura; nsps, proteine non strutturali; NTD, dominio N-terminale; RBD, dominio legante il recettore; S, subunità; SD, sottodominio; TM, regione transmembrana; TMPRSS2, serina proteasi 2 transmembrana; UTR, regione non tradotta.

un aumento di linfociti B, linfociti T helper follicolari e linfociti T CD8+ e CD4+ attivati. La risposta anticorpale primaria è marcata dalla comparsa di anticorpi IgM e si osserva entro la prima settimana dai primi sintomi. Segue la comparsa di anticorpi IgG e IgA. Gli anticorpi riconoscono principalmente epitopi della proteina S, N e M (43). Alcuni anticorpi hanno attività neutralizzante, soprattutto quelli con affinità per Spike (44), e sono in grado di bloccare l'entrata del virus nella cellula, rendendo il soggetto immune all'infezione virale. Idealmente un vaccino per SARS-CoV-2 dovrebbe indurre anticorpi neutralizzanti di lunga durata, ma non è ancora noto per quanto tempo persistano gli anticorpi

specifici in individui colpiti da COVID-19 o per quanto tempo persistono dopo la vaccinazione.

D'altra parte, è stato osservato che i pazienti affetti da una forma grave di COVID-19 presentano linfopenia, che è considerata un biomarcatore di gravità. In particolare, si osserva una riduzione di linfociti T della memoria e linfociti CD8+ citotossici. Inoltre, in questi casi, è stato riscontrato un aumento di linfociti T helper pro-infiammatori che producono IL-17 (detti linfociti Th17), e un aumento dell'attività citotossica dei linfociti T CD8+. Questo potrebbe spiegare il tipico danno anatomico polmonare indotto dalla malattia, la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), in quanto l'IL-17

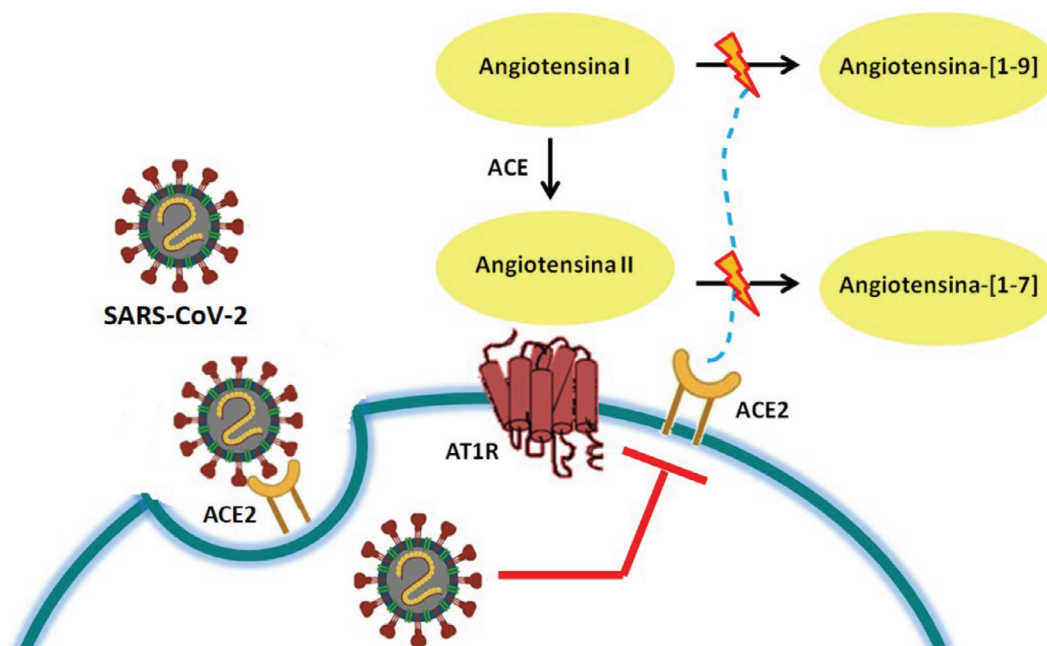


Figura 2

Interazione tra SARS-CoV-2 ed il sistema renina-angiotensina-aldosterone.

SARS-CoV-2 si lega all'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), espresso principalmente a livello polmonare, dai pneumociti di tipo II, ma anche in molti altri organi. Dopo l'endocitosi del complesso virale, l'espressione in membrana di ACE2 è ulteriormente ridotta, determinando un accumulo di angiotensina II. L'attivazione locale del sistema renina-angiotensina-aldosterone può mediare le risposte di danno polmonare agli insulti virali.

ACE, enzima di conversione dell'angiotensina; AT1R, recettore dell'angiotensina tipo II.

contribuisce alla distruzione del parenchima polmonare attraverso il reclutamento dei neutrofili e l'induzione di altri mediatori pro-infiammatori. La linfopenia è spesso accompagnata da una riduzione di eosinofili, basofili e monociti e da un aumento di neutrofili (45).

LE DIVERSE TECNOLOGIE IMPIEGATE NELLO SVILUPPO DI VACCINI PER SARS-CoV-2

La produzione di un vaccino che risulti efficace e sicuro è un processo molto lungo, richiede normalmente dai 10 ai 15 anni (46), consta di diverse fasi e presuppone una buona conoscenza dell'agente eziologico della malattia. Inizialmente si effettuano studi sperimentali *in vitro* in base ai quali è possibile stabilire la composizione quantitativa e qualitativa del vaccino. In seguito, il potenziale vaccino viene sottoposto a sperimentazione pre-clinica, che include studi *in vitro* e su modelli animali, per definire il meccanismo d'azione e valutare il profilo tossicologico. Infine, si susseguono tre fasi cliniche sull'essere umano, in cui viene progressivamente aumentata la popolazione trattata con il vaccino, definita la posologia e caratterizzata l'efficacia e la sicurezza. Il tutto si conclude con l'autorizzazione, l'immissione in commercio e gli studi post-marketing che valutano l'efficacia e la sicurezza del vaccino nelle reali condizioni d'uso. Per far fronte alla pandemia da COVID-

19, tale processo di sviluppo ha subito un'accelerazione senza precedenti a livello globale. La fase pre-clinica e la fase 1 dei test clinici sono state condotte parallelamente per 6-9 mesi e altri 6-9 mesi sono stati impiegati per condurre simultaneamente le fasi 2 e 3 dei test clinici. In ogni caso, tale procedura non ha reso in alcun modo gli studi meno rigorosi. Nessuna tappa, infatti, è venuta meno, e questo è stato possibile grazie a diversi fattori: ricerche già condotte in passato sulla tecnologia a mRNA, studi sui coronavirus correlati al SARS-CoV-2, ingenti risorse umane ed economiche messe a disposizione in tempi stretti, produzione del vaccino parallelamente agli studi e al processo di autorizzazione e valutazione da parte delle agenzie regolatorie dei risultati ottenuti, mentre questi venivano prodotti (*rolling review*) e non, come generalmente si usa fare, solo dopo il completamento di tutti gli studi.

Vaccini proteici

Lo sviluppo di vaccini proteici contro il SARS-CoV-2 è uno degli approcci maggiormente utilizzati. Inizialmente, le proteine si ottenevano tramite la purificazione dai patogeni. Oggi, grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, è possibile ottenere le proteine *in vitro* da vettori di espressione consolidati, efficienti e sicuri. Sono vaccini relativamente semplici da realizzare e abbastanza economici da produrre rispetto ai vaccini

tradizionali. Sebbene i vaccini proteici abbiano un buon profilo di sicurezza, hanno in genere bassi livelli di immunogenicità, per cui richiedono in genere l'uso di adiuvanti per migliorare la loro efficacia. La principale proteina utilizzata per lo sviluppo di questi vaccini è la proteina Spike di SARS-CoV-2, ma in alcuni casi è stata utilizzata la proteina N del nucleocapside. Ad oggi sono quattro i vaccini a subunità proteica approvati (Tabella 1): EpiVacCorona, sviluppato all'interno del State Research of Virology and Biotechnology VECTOR, in Siberia, RBD Dimer (ZF2001) prodotto in collaborazione con l'Accademia delle Scienze Cinese, MVC-COV1901 (Medicgen, Taiwan) e Abdala (CIGB-66), sviluppato dal Center for Genetic Engineering and Biotechnology di Cuba. Per tutti e quattro è prevista la somministrazione intramuscolare (47).

Attesa a breve è invece l'approvazione del vaccino NVX-CoV2373, sviluppato dall'azienda biotecnologica statunitense Novavax, formato da una nanoparticella lipidica su cui sono assemblate fino a 14 unità di proteina Spike in conformazione pre-fusione ottenute mediante la tecnologia del DNA ricombinante. Un altro vaccino proteico sviluppato dall'Università del Queensland (Australia), nonostante i buoni risultati in fase 1, non proseguirà invece verso le fasi successive, dal momento che induce la formazione di anticorpi contro la proteina gp41 di HIV-1, usata per stabilizzare il vaccino, che potrebbero interferire con i test sierologici per la diagnosi dell'infezione da HIV (48).

Appartengono a questa categoria anche i vaccini costituiti da particelle simil-virali (VLP) contro il SARS-CoV-2, in fase di sperimentazione. Di particolare interesse è l'innovativo vaccino nato da una collaborazione tra Medicago (Canada) e l'industria farmaceutica inglese GlaxoSmithKline (GSK), che si basa su VLP Spike prodotte dalle cellule vegetali di *Nicotiana benthamiana*, parente stretta della pianta di tabacco, combinate con un adiuvante. Questa tecnologia, già sperimentata con il vaccino antinfluenzale, potrebbe consentire la produzione massiva di vaccini VLP a prezzi contenuti (1,49).

Infine, due vaccini coniugati in fase di studio rappresentano una variante di quelli proteici tradizionali. Si tratta dei vaccini Soberana 01 (FINLAY-FR-1A) e Soberana 02 (FINLAY-FR-2), sviluppati dall'Istituto Finlay de Vacunas di Cuba. Entrambi contengono le sequenze RBD di Spike coniugate rispettivamente con il polisaccaride capsulare del meningococco B o con il tossoide tetanico (1).

Vaccini inattivati

I vaccini basati su SARS-CoV-2 inattivati, hanno il vantaggio di essere meno costosi e più sicuri rispetto a quelli basati su virus vivi attenuati ed inducono una risposta contro più antigeni rispetto a quelli proteici, ma più debole rispetto a quelli attenuati, necessitando perciò di adiuvanti. L'inattivazione, inoltre, solitamente effettuata chimicamente con β -propiolattone, comporta il rischio di alterazione della struttura terziaria di Spike e

delle sue proprietà antigeniche (50). Otto vaccini contenenti il virus inattivato sono già stati approvati in più di 100 paesi nel mondo (47).

Vaccini vivi attenuati

La tecnologia basata sull'utilizzo di virus SARS-CoV-2 attenuati con metodi classici, permette di produrre vaccini altamente immunogenici già in singola somministrazione, che non richiedono adiuvante e inducono un'immunità di lunga durata. Sviluppare rapidamente un vaccino vivo attenuato contro il SARS-CoV-2 risulta essere però molto complicato: sono infatti necessarie approfondite conoscenze di base del genoma e della biologia del virus per garantire che sia adeguatamente attenuato e che tutti i fattori di virulenza vengano rimossi (34). Inoltre, l'attenuazione di grandi quantità di virus è un'operazione difficoltosa e delicata, che può comportare rischi di biosicurezza. Infine, una volta prodotti, questi vaccini necessitano di rigorose procedure per lo stoccaggio e la manipolazione. Attualmente, solo un vaccino basato su SARS-CoV-2 attenuato, COVI-VAC (Serum Institute of India, in collaborazione con Codagenix, New York), è in corso di studio, per ora limitato alla fase 1 (46).

Vaccini basati su vettori virali

Un metodo moderno per veicolare gli antigeni virali contro cui indurre una risposta immunitaria consiste nella produzione di vettori virali ricombinanti. In questi vaccini il gene codificante la proteina Spike viene inserito all'interno di un vettore virale innocuo, solitamente un adenovirus non replicante, che viene così a esprimere l'antigene di SARS-CoV-2. Poiché il genoma degli adenovirus è formato da DNA, l'RNA codificante Spike viene trasformato in DNA complementare (cDNA) prima di essere inserito nel vettore e viene reso di conseguenza molto più stabile.

Nella maggior parte dei casi, i vettori virali sono resi incapaci di replicarsi e quindi molto più sicuri, attraverso la delezione di regioni genomiche necessarie per la replicazione. In altri casi, invece, il gene di Spike viene inserito all'interno di vettori virali attivi nella replicazione: questi virus hanno la capacità di propagarsi e possono indurre una risposta immunitaria più intensa (Figura 3). D'altro canto, la capacità replicativa li rende potenzialmente più pericolosi non solo dal punto di vista infettivologico, ma anche per il rischio che un'eventuale integrazione del genoma virale in quello delle cellule ospiti possa avviare un processo di tumorigenesi (51). Alcuni esempi sono il vaccino a somministrazione spray nasale basato sul virus respiratorio sinciziale (RSV) esprimente Spike (46), oppure vaccini ricombinanti basati sul virus del morbillo, della stomatite vescicolare e sul virus del vaiolo.

Un potenziale svantaggio nell'uso di vettori virali normalmente in grado di causare infezioni nell'essere umano è la formazione di immunoglobuline neutralizzanti contro il vettore stesso, oltre che contro l'antigene bersaglio, fenomeno che potrebbe

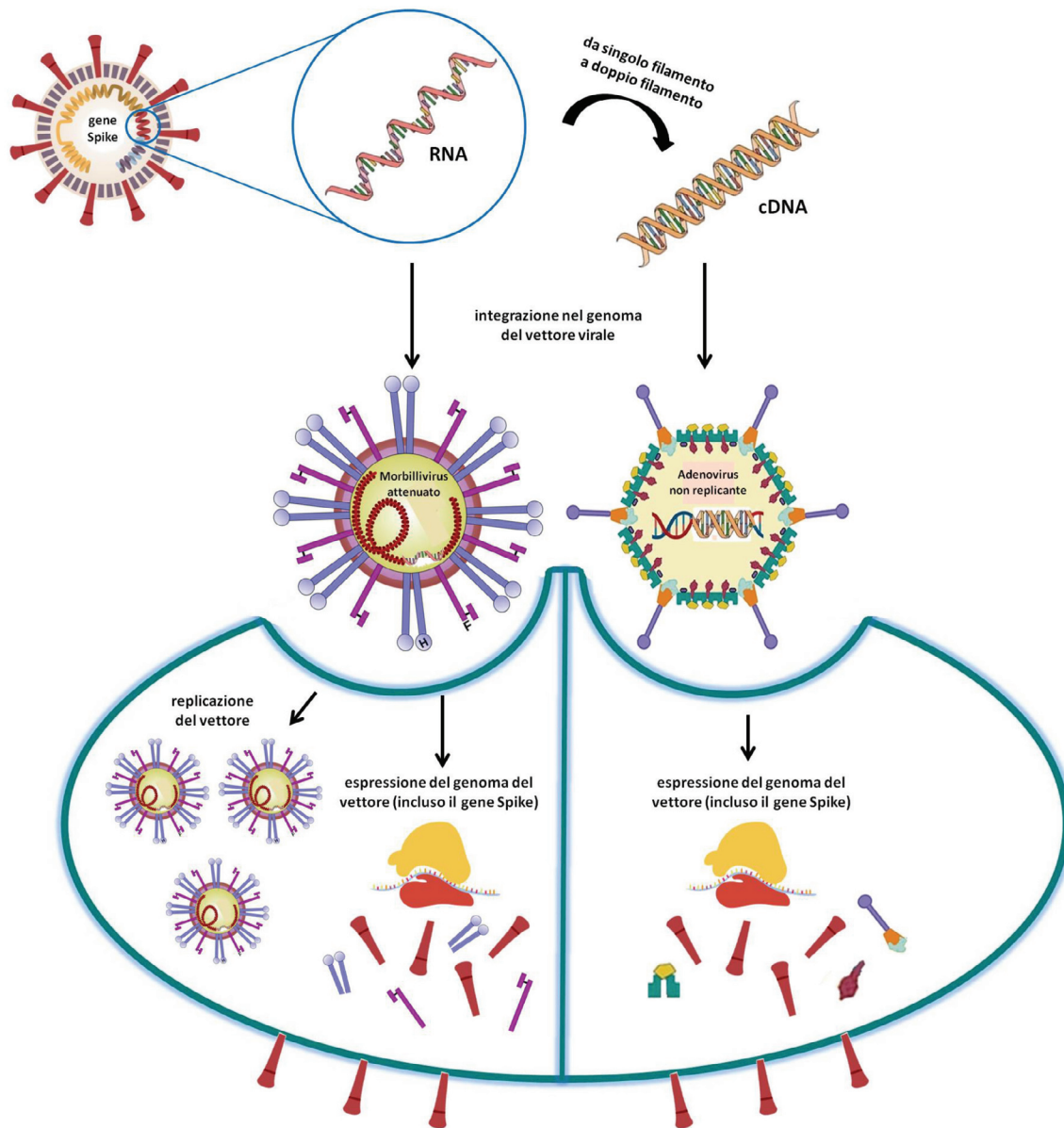


Figura 3

Meccanismo d'azione di due tipologie di vaccini basati su vettori virali contro il SARS-CoV-2: vettori virali replicanti e vettori virali non replicanti.

Il segmento di RNA di SARS-CoV-2 codificante la glicoproteina Spike viene inserito nel genoma di un vettore virale attraverso un processo di ingegnerizzazione genetica. Se il vettore possiede un genoma a base di DNA, è necessario un passaggio intermedio per trasformare l'RNA a singolo filamento in una molecola di DNA complementare (cDNA) a doppio filamento. Nella parte sinistra dell'immagine, il vettore è il virus del morbillo, che mantiene la sua capacità replicativa benché attenuato. Nella parte destra, invece, il vaccino è a base di un adenovirus non replicante, che si limita a veicolare l'antigene di interesse sotto forma di RNA. In entrambi i casi, una volta penetrati nella cellula con cui interagiscono, i vettori virali sfruttano la sua trascrizione per sintetizzare sia le loro proteine, sia Spike codificata dall'RNA inserito nel loro genoma, che verrà in seguito presentata sulla superficie inducendo una risposta immunitaria. cDNA, acido desossiribonucleico complementare; RNA, acido ribonucleico.

compromettere l'efficacia del vaccino. Ecco perché vengono spesso utilizzati come vettori virus non umani, ma di altri primati, quali gli scimpanzé o i gorilla, oppure, in caso di più somministrazioni, vettori diversi tra la prima e la seconda dose. Per esempio, il vaccino sviluppato da

AstraZeneca e dall'Università di Oxford (AZD1222) è composto da un singolo vettore ricombinante di adenovirus di scimpanzé con deficit di replicazione (ChAdOx1), che codifica per la glicoproteina Spike di SARS-CoV-2. È stato approvato il 29 gennaio 2021

dall'EMA per l'utilizzo nei soggetti al di sopra dei 18 anni di età e, sotto il nome di Covishield, è stato distribuito anche in India e in Nepal (52) e ha dimostrato complessivamente un'efficacia del 64,1% nella riduzione delle infezioni sintomatiche da COVID-19 dopo una dose standard e del 70,4% dopo la seconda dose.

Il vaccino russo Sputnik V, sviluppato da Gamaleya, si basa invece sull'utilizzo di due diversi vettori adenovirali umani, entrambi responsabili del raffreddore comune, rAd26 per la prima dose e rAd5 per la seconda dose, a distanza di 21 giorni. Questa tecnica è stata scelta per impedire lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti diretti contro il vettore nella finestra temporale tra le due dosi, che avrebbero potuto rendere meno efficace la seconda (53).

Un altro vaccino approvato che sfrutta un vettore adenovirale ingegnerizzato non replicante è quello sviluppato dalla società farmaceutica statunitense Johnson&Johnson. Anche in questo caso, il vettore, sierotipo 26 (Ad26), esprime la proteina Spike di SARS-CoV-2, che è stata stabilizzata in fase di pre-fusione (54). Si è dimostrato efficace al 66,1% dopo 28 giorni dalla vaccinazione, in tutti gli adulti di età pari o superiore a 18 anni, soprattutto per la prevenzione della malattia grave, dove ha raggiunto un'efficacia dell'85,4% (55).

Vaccini a mRNA

Le tecnologie basate sugli acidi nucleici hanno permesso di ottenere, in tempi molto brevi, una grande quantità di vaccini contro il SARS-CoV-2. Di attuale interesse sono i due promettenti vaccini a mRNA sviluppati da Pfizer/BioNTech e Moderna, il cui uso emergenziale è stato raccomandato dall'EMA, rispettivamente il 21 dicembre 2020 e il 6 gennaio 2021¹.

Il vaccino anti-COVID-19 mRNA BNT162b2 (Comirnaty) di Pfizer/BioNTech è destinato a prevenire la malattia da COVID-19 nei soggetti di età pari o superiore ai 16 anni. Viene somministrato in due iniezioni intramuscolari a distanza di almeno 21 giorni l'una dall'altra e, prima dell'uso, necessita di una diluizione. L'RNA messaggero, modificato a livello dei nucleosidi, è formulato in nanoparticelle lipidiche che ne permettono l'ingresso nelle cellule umane e lo proteggono da una degradazione precoce (50). Gli antigeni sintetizzati stimolano la risposta anticorpale della persona vaccinata con produzione di anticorpi neutralizzanti e inducono inoltre una reazione cellulo-mediata attraverso l'attivazione dei linfociti T (56).

Il vaccino anti-COVID-19 mRNA-1273 di Moderna è indicato a partire dai 18 anni di età, prevede due iniezioni intramuscolari a distanza di 28 giorni e l'immunità si considera pienamente acquisita a partire da due settimane dalla somministrazione della seconda dose. Anche questo vaccino contiene mRNA, inserito in nanoparticelle lipidiche, che codifica per la proteina Spike intera stabilizzata in conformazione di pre-fusione e ha dimostrato un'efficacia del 94,1% (IC 89,3-96,8) (57).

L'EMERGENZA DI NUOVE VARIANTI DI SARS-CoV-2

Una conseguenza naturale della replicazione virale e dell'interazione con le cellule ospiti è l'insorgenza di mutazioni all'interno del genoma del virus. I meccanismi principali alla base di questo fenomeno sono essenzialmente tre: errori di copiatura, soprattutto durante le infezioni prolungate con alto tasso di replicazione, co-infezione di una stessa cellula da parte di due linee virali e ricombinazione tra di esse, induzione di modifiche nel genoma da parte della cellula ospite come parte dell'immunità naturale o della pressione selettiva indotta da farmaci o vaccini. I virus a RNA sono più propensi a generare varianti rispetto a quelli a DNA, a causa di una RNA polimerasi che è spesso priva dell'attività di *proofreading* (58). I coronavirus tendono a generare meno mutazioni rispetto ad altri virus a RNA poiché la loro polimerasi possiede una parziale attività di correzione durante l'appaiamento delle basi. Ciononostante, la selezione naturale può comunque generare delle varianti come vantaggio nella competizione con altri patogeni o come strategia di evasione dal sistema immunitario (59).

Allo stato attuale sono state identificate alcune varianti clinicamente significative, illustrate nella Tabella 2 secondo i tre sistemi di nomenclatura più utilizzati (GISAID, Nextstrain e Pangolin) (60-79). Sono tutte causate da mutazioni puntiformi nel gene codificante la glicoproteina Spike, in particolare nel dominio contenente il RBD, il bersaglio principale degli anticorpi generati contro SARS-CoV-2. Questo può comportare un'alterazione della virulenza, possibile resistenza ai vaccini, oltre a una ridotta affinità degli anticorpi normalmente utilizzati per i test immunologici, con possibili implicazioni anche nella diagnostica di laboratorio.

L'OMS e il SARS-CoV-2 Interagency Group (SIG) hanno classificato le varianti di SARS-CoV-2 come VOI (*variants of interest*), ovvero forme virali con mutazioni che hanno possibili implicazioni fenotipiche e responsabili di focolai in varie aree geografiche, oppure come VOC (*variants of concern*), cioè varianti di interesse caratterizzate però da maggiore trasmissibilità e/o virulenza e/o che determinano una minore efficacia delle strategie diagnostiche, terapeutiche e di prevenzione. Esistono infine varianti con cambiamenti genetici sospetti ma con un impatto fenotipico ancora da chiarire e monitorare, definite come "*alerts for further monitoring*". Secondo i dati più recenti, la variante B.1.1.7 (Alfa) è più trasmissibile e virulenta, ma sembra conservare la suscettibilità ai vaccini del virus originale (73-77). Le varianti B.1.525 (Eta), B.1.351 (Beta), B.1.149 e B.1.427 (Epsilon) presentano una ridotta sensibilità agli anticorpi neutralizzanti (78,79). Le tre varianti indiane B.1.617 V1, V2 e V3 (Delta) e quella con mutazione P.1 (Gamma) risultano più trasmissibili e meno suscettibili alla neutralizzazione anticorpale (80,81).

¹Sebbene inizialmente approvato a titolo emergenziale, attualmente (settembre 2021), il vaccino Pfizer ha ricevuto un'approvazione globale.

Tabella 2
Elenco e caratteristiche delle principali varianti di SARS-CoV-2 finora identificate (dati aggiornati ad agosto 2021)

Variants of concern						
Classificazione OMS	Classificazione PANGO (60)	Classificazione GISAID (61)	Classificazione Nextstrain (62)	Mutazioni in Spike	Luogo e data della prima identificazione	Caratteristiche
Alfa	B.1.1.7	GRY (precedentemente GR/501Y.V1)	20I (V1)	E484K*, S494P*, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, K1191N*, 69del, 70del, 144del	Gran Bretagna settembre 2020	Aumentata trasmissibilità (63) Aumentato rischio di ospedalizzazione (76) e di mortalità (77) Impatto minimo sulla sensibilità agli anticorpi neutralizzanti (64,75,82,83)
Beta	B.1.351 B.1.351.2 B.1.351.3	GH/501Y.V2	20H (V2)	D80A, D215G, 241del, 242del, 243del, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	Sudafrica maggio 2020	Aumentata trasmissibilità Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (83)
Gamma	P.1 P.1.1 P.1.2	GR/501Y.V3	20J (V3)	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I	Brasile, Giappone novembre 2020	Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (65)
Delta	B.1.617.1 AY.1 AY.2	G/478K.V1	21A	T19R, G142D*, I56del, 157del, R158G, E484Q, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	India ottobre 2020	Aumentata trasmissibilità (maggiore rispetto alla variante Alfa) (66,73) Aumentato rischio di ospedalizzazione (73) Possibile resistenza agli anticorpi neutralizzanti (67)
VARIANTS OF INTEREST						
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	A67V, 69del, 70del, 144del, E484K, D614G, Q677H, F888L	Vari paesi dicembre 2020	Possibile resistenza agli anticorpi neutralizzanti (68)
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	L5F, D80G*, T95I, Y144*, F157S*, D253G, L452R*, 477N*, E484K, D614G, A701V, T859N*, D950H*, Q957R*	Stati Uniti novembre 2020	Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (69)
Kappa	B.1.617.1 B.1.617.3	G/452R.V3	21B	T95I, G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H, T19R, D950N	India ottobre 2020	Possibile resistenza agli anticorpi neutralizzanti (70)
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	del246-252, G75V, T76I, L452Q, F490S, T859N	Perù dicembre 2020	Aumentata trasmissibilità Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (71)
ALERTS FOR FURTHER MONITORING						
Epsilon	B.1.427 B.1.429	GH/452R.V1	21C	L452R, D614G, S13I, W152C	California marzo 2020	Trasmissibilità aumentata del 20% (67) Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (79)
Theta	P.3	GR/1092K.V1	21E	E484K, N501Y, D614G, P681H	Filippine gennaio 2021	Aumentata trasmissibilità Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (72)
Zeta	P.2	GR/484K.V2	20B/S.484K	E484K, F565L*, D614G, V1176F	Brasile aprile 2020	Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (61)

La preoccupazione riguardante la ridotta efficacia dei vaccini contro le varianti di recente insorgenza, alcune delle quali stanno diventando (o sono già diventate) prevalenti in alcune aree geografiche, ha indotto a potenziare il monitoraggio della risposta della popolazione alle campagne vaccinali e ad intensificare gli sforzi volti a modificare i vaccini nel caso dovessero risultare meno efficaci. Fortunatamente, sembra che i vaccini attualmente approvati funzionino anche contro le forme varianti di SARS-CoV-2, anche se con efficacia ridotta, soprattutto se vengono somministrate tutte le dosi previste dalla schedula vaccinale (82-84). La scelta di utilizzare una forma della proteina Spike stabilizzata in conformazione di pre-fusione in alcuni vaccini (Moderna, Pfizer/Biontech, Johnson&Johnson, Novavax) potrebbe spiegare la maggiore efficacia nei confronti di alcune varianti. A questo proposito un gruppo di ricercatori ha sviluppato una nuova versione di Spike nota come HexaPro contenente sei mutazioni anziché due, che la stabilizzano ulteriormente, aumentandone l'espressione e rendendola anche più resistente a temperature estreme (85). Questa strategia potrebbe rendere i vaccini più efficaci anche contro le varianti del virus e semplificare le difficoltà logistiche nella loro distribuzione.

IL RUOLO DEL LABORATORIO CLINICO NEL MONITORAGGIO DELLA CAMPAGNA VACCINALE

La medicina di laboratorio si è dimostrata fondamentale già a partire dalla prima ondata della pandemia da COVID-19. Da un lato, l'analisi molecolare di tamponi rinofaringei attraverso Real-Time PCR o i test rapidi antigenici e la sierologia hanno permesso la rapida diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2, seppur con i limiti di variabilità pre-analitica e di accuratezza finale, che non è mai del 100% e che varia ampiamente in base al metodo utilizzato (86). Dall'altro, il monitoraggio di diversi parametri ematologici, biochimici e di coagulazione tradizionali ha consentito il monitoraggio del paziente durante il decorso clinico della malattia e ha fatto emergere l'interessante valore prognostico e predittivo di alcuni biomarcatori (45,87-89).

Anche durante la campagna vaccinale il laboratorio ha svolto e svolge un ruolo di primo piano nella valutazione dell'efficacia dei vaccini e della copertura vaccinale della popolazione, oltre che nel monitoraggio di potenziali eventi avversi correlati alla vaccinazione. L'efficacia di un vaccino non si riferisce solamente all'efficacia biologica, rilevabile e quantificabile valutando la risposta immunitaria all'antigene di interesse attraverso test sierologici e di neutralizzazione, ma anche e soprattutto all'efficacia clinica, che permette di vedere i risultati epidemiologici di una campagna vaccinale più nell'immediato. Con efficacia clinica si intende la prevenzione dell'infezione in generale, sintomatica e non, e, in secondo luogo, la prevenzione delle forme clinicamente più gravi, che impattano

maggiormente sulla salute pubblica e sulla mortalità. Comprendere se la strategia vaccinale sta andando nella giusta direzione significa quindi fare un costante bilancio tra gli inevitabili rischi e i benefici e rivalutarlo di volta in volta prendendo decisioni di conseguenza.

I test sierologici nel monitoraggio della risposta anticorpale post-vaccino

Sicuramente il monitoraggio della risposta anticorpale attraverso i test sierologici rappresenta uno dei cardini dell'attività del laboratorio durante la campagna vaccinale. Tuttavia, occorre attenersi il più possibile a linee guida condivise, per permettere un buon livello di armonizzazione e standardizzazione, riproducibilità e quindi affidabilità dei risultati. Le metodiche su cui si basano i vari test disponibili sono molteplici e spesso è stata rilevata una buona correlazione inter-metodo, che però non raggiunge mai il 100%. In questo senso, una volta scelto un metodo, è preferibile seguire lo stesso anche nelle valutazioni successive.

Dato che la proteina Spike rappresenta il principale bersaglio antigenico della risposta immunitaria, i test sierologici dovrebbero misurare le immunoglobuline dirette in modo specifico contro questo antigene attraverso metodiche quantitative e non solo qualitative in grado anche di distinguere i diversi sierotipi anticorpali. La discriminazione tra IgM e IgG risulta utile per la comprensione dell'andamento della risposta immunitaria all'antigene introdotto con il vaccino, della capacità di costituire una memoria immunitaria e soprattutto della sua durata. A questo proposito, non è ancora nota la durata effettiva della protezione immunitaria post-infezione o post-vaccino e allo stato attuale è possibile basarsi esclusivamente sulle informazioni riguardanti altri coronavirus, come SARS-CoV o MERS-CoV, che indicano una durata della risposta anticorpale di circa due anni e di quella cellulo-mediata fino a sei anni (90-92). Tuttavia, per SARS-CoV-2, iniziano a emergere i primi dati sulla sieropositività post-infezione e indicano che le IgG sembrano persistere a 6-8 mesi dopo l'infezione nel 90% dei soggetti (93,94). Un'altra interessante classe di anticorpi meritevoli di attenzione è quella delle IgA, le immunoglobuline mucosali che rappresentano uno dei primi sistemi di difesa contro l'ingresso del virus. È interessante notare come la misura delle IgA abbia rivelato un'emivita addirittura superiore rispetto alle IgG e un aumento più precoce dopo l'infezione (95), oltre che una buona capacità neutralizzante a livello delle mucose (96,97). Gli immunodosaggi preferibilmente quantitativi permettono quindi di definire il livello minimo di protezione garantita dal vaccino e di chiarire se e quando sarà necessario un richiamo.

Inoltre, come esposto poco sopra, i virus a RNA come SARS-CoV-2, a causa della mancanza di meccanismi di riparazione molecolari, sono soggetti a frequenti mutazioni. Per questo motivo, è importante che durante lo sviluppo del vaccino vengano presi in

considerazione anche i ceppi con diverse mutazioni per impedire che questi sfuggano al riconoscimento immunitario. Dall'inizio della pandemia ad oggi, sono state rilevate molte varianti di SARS-CoV-2, la maggioranza delle quali non altera significativamente l'assetto e le componenti del virus. Alcune mutazioni, però, come la L452R, la D614G e la E484Q nel RBD o la P681R nel sito di clivaggio della furina di Spike, riscontrate nella variante Delta, attualmente predominante in molti paesi (98), potrebbero aumentare la trasmissibilità del virus favorendo non solo l'interazione con ACE2 ma anche il taglio enzimatico S1-S2 per un miglior ingresso all'interno della cellula ospite (81). Allo stesso modo, c'è il rischio di una ridotta sensibilità alla neutralizzazione anticorpale, anche se in questo caso i dati in merito sono contrastanti. Uno studio di Weissman et al. su pseudovirus ha infatti dimostrato come la stessa mutazione D614G, se da un lato modifica la conformazione del RBD di Spike favorendo l'ingresso di SARS-CoV-2, dall'altro ne espone maggiormente l'epitopo riconosciuto dagli anticorpi, rendendolo più suscettibile alla neutralizzazione (99).

Molti aspetti relativi all'efficacia dei vaccini sono ancora controversi e necessitano di studi a lungo termine. Tenendo conto della recente comparsa di forme varianti di SARS-CoV-2, che potrebbero complicare i test immunometrici con risultati falsi negativi e diminuire la capacità neutralizzante delle immunoglobuline nonostante la sieropositività (85,100,101), la medicina di laboratorio potrebbe svolgere un ruolo essenziale per un continuo monitoraggio dell'emergenza di nuove varianti tramite sequenziamento e nel costante aggiornamento delle informazioni a supporto della campagna vaccinale. A questo proposito, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha introdotto la piattaforma I-Co-Gen per condividere i dati relativi alla sorveglianza genomica a livello nazionale. L'obiettivo è produrre due rapporti periodici, un'indagine rapida per "fotografare" il sequenziamento di campioni raccolti in un determinato giorno e un bollettino con i dati quotidiani provenienti dalle regioni su campioni casuali e categorie particolari, come le re-infezioni o le infezioni in soggetti già vaccinati (102,103).

I test di laboratorio nella prevenzione e nel monitoraggio degli eventi avversi

La recente rilevazione di alcuni casi di trombosi con trombocitopenia correlate ai vaccini (*vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia*, VITT) di AstraZeneca e Johnson&Johnson ha reso necessaria la rapida diagnosi di questi episodi e l'individuazione di test di laboratorio e biomarcatori utili a predire il loro sviluppo e/o la progressione verso esiti più severi. I primi casi di alterazione della coagulazione e del conteggio e della funzione piastrinica sono stati descritti poco dopo l'inizio della campagna vaccinale su larga scala, in relazione ai vaccini ChAdOx1 nCov-19 di AstraZeneca (104,105), Ad.26. COV2.S di Johnson&Johnson (106,107) ed in misura minore anche ai vaccini ad mRNA (108). La fisiopatologia del fenomeno è apparsa da subito molto

simile alla già nota trombocitopenia indotta da eparina (heparin-induced thrombocytopenia, HIT), in particolare a una HIT autoimmune, ovvero una reazione immunomediata che induce la formazione di anticorpi diretti contro i complessi eparina-fattore piastrinico 4 (PF4) e che comporta un'inappropriata attivazione e aggregazione piastrinica. Ne consegue una piastrinopenia da consumo e attivazione della cascata coagulativa con possibili esiti trombotici e, paradossalmente, anche emorragici a causa della bassa conta piastrinica e del consumo di fattori della coagulazione. Nel caso della VITT, i complessi bersaglio degli anticorpi sembrano essere costituiti da PF4 e da un polianione simile alla molecola eparinica, che potrebbe derivare dal DNA del vettore adenovirale, comune ad entrambi i vaccini implicati. Questi immunocomplessi interagirebbero con i recettori FcγRIIIa delle piastrine, attivandole e stimolandone l'aggregazione. L'adenovirus potrebbe anche attivare direttamente le piastrine interagendo con il fattore di von Willebrand o con la P-selettina, oppure può veicolare l'espressione di Spike nei megacariociti, rendendoli potenziali bersagli degli anticorpi anti-Spike (109). Greinacher et al. hanno invece proposto che l'EDTA contenuto nel vaccino potrebbe favorire la permeabilità vascolare e la disseminazione di componenti del vaccino, che interagirebbero con anticorpi naturali innescando un danno da immunocomplessi (110). Da citare infine l'ipotesi di Kowarz et al., secondo cui potrebbe avvenire uno splicing alternativo dell'RNA di Spike, favorito dall'adenovirus stesso, che causerebbe la produzione di una forma più corta della proteina Spike priva del sito di ancoraggio alla membrana e quindi libera di circolare e di legarsi a recettori ACE2 sulle cellule endoteliali, favorendo eventi trombotici (111).

La VITT è una sindrome clinicamente distinta dalle alterazioni dell'emostasi già descritte nel corso dell'infezione grave da SARS-CoV-2 e con alcune peculiarità rispetto alla HIT classica: coinvolge spesso sedi atipiche venose e arteriose (vasi splanchnici, aorta, seni venosi cerebrali), determina una coagulopatia da consumo e una piastrinopenia significativa (descritti casi con meno di 10×10^9 piastrine/L) e si associa a una sieropositività per immunocomplessi anti-PF4 (104,112). È stata descritta soprattutto in donne con meno di 55 anni, con esordio tra i 5 e i 28 giorni dopo la vaccinazione e con manifestazioni cliniche quali cefalea persistente, alterazioni visive, dolore addominale, gonfiore e dolore agli arti inferiori, dispnea, dolore toracico (113,114).

Il laboratorio può contribuire notevolmente al riconoscimento di questi fenomeni già a partire dalle analisi emocromocitometriche per il conteggio piastrinico e dai test di coagulazione standard (PT, aPTT, fibrinogeno, D-dimero). La diagnosi specifica di VITT implica però anche la determinazione degli anticorpi anti-PF4, che presenta un forte valore predittivo negativo, preferibilmente attraverso test ELISA (114), in associazione a test funzionali di aggregazione piastrinica (*heparin-induced platelet aggregation*, HIPA),

utile soprattutto in caso di discrepanza con i test immunologici (115). La presenza di anticorpi anti-PF4, inoltre, non si associa necessariamente a una piastrinopatia. La loro patogenicità deve pertanto essere considerata solo in caso di positività del test HIPA (113). Gli stessi test risultano inoltre fondamentali durante il trattamento del paziente con VITT, indirizzando verso la necessità di anticoagulanti non eparinici, trasfusione di piastrine o plasmaferesi nei casi più gravi (113,114).

CONCLUSIONI

Sin dal suo esordio con il focolaio di Wuhan nel novembre 2019, la pandemia da COVID-19 ha messo l'intera popolazione mondiale di fronte ad una sfida senza precedenti, sovvertendo l'economia, l'istruzione e la gestione pubblica e compromettendo la piena funzionalità dei sistemi sanitari della maggior parte dei Paesi del mondo. Nella comunità scientifica, ha indotto un'affannosa (ma fruttuosa) ricerca di mezzi per contrastare l'infezione da SARS-CoV-2, soprattutto nel campo dei vaccini, che appaiono oggi la modalità di prevenzione primaria più efficace, accompagnata dalle misure igieniche come l'uso della mascherina ed il distanziamento sociale.

In questo scenario, fin da subito è apparso evidente il ruolo chiave della Medicina di Laboratorio, in particolare nell'individuare i parametri di laboratorio utili ai clinici per valutare la prognosi dei pazienti affetti dalle forme gravi di COVID-19 e per poter discriminare i soggetti ad evoluzione più sfavorevole, che richiedevano il ricovero in terapia intensiva ed il supporto respiratorio; nel processo diagnostico dell'infezione attraverso test molecolari, antigenici rapidi o sierologici; infine nella campagna vaccinale, la cui efficacia è stata monitorata sin dal suo esordio analizzando la risposta immunitaria al vaccino, non solo in termini di titolo anticorpale ma anche e soprattutto valutando la capacità neutralizzante degli anticorpi stessi. Il contributo si è quindi esteso anche alla definizione e al monitoraggio degli eventi avversi clinicamente significativi, a partire dalla più volte citata VITT, ribadendo il ruolo di primo piano degli esami di laboratorio nel processo diagnostico e di prevenzione e nella determinazione di potenziali fattori predittivi.

Nonostante le criticità che la pandemia ha comportato, alcuni suoi aspetti potrebbero quindi apparire come un potenziale vantaggio per il futuro. Se da un lato la pandemia ha rappresentato una sfida globale inaspettata, dall'altro ha permesso di sperimentare nuove tecnologie e nuovi approcci nel campo della prevenzione. La rapidità degli studi e l'impegno tecnologico per lo sviluppo di un vaccino sono stati sicuramente fuori dall'ordinario. In pochi mesi sono stati fatti numerosi passi in avanti nel campo della biologia molecolare e delle nanotecnologie, vaccini prima approvati solo in ambito veterinario, come quelli a DNA, sono stati sperimentati anche nell'uomo e altri finora testati solo in campo oncologico, come i vaccini a mRNA, hanno dimostrato di essere efficaci anche per contrastare alcune malattie infettive. Tra le tante

conseguenze della pandemia, è pertanto possibile rilevare anche un potenziale vantaggio per la ricerca che, grazie alle solide basi poste da questa inaspettata spinta a studiare nuovi approcci, sarà sicuramente favorita in futuro in ambiti che si estendono ben oltre COVID-19.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol* 2020;202:162-92.
2. Agenzia Italiana del Farmaco, Vaccini COVID-19, <https://www.aifa.gov.it/vaccini-covid-19> (ultimo accesso: giugno 2021).
3. European Medicines Agency, COVID-19 vaccines: authorised. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorized#authorized-covid-19-vaccines-section> (ultimo accesso: giugno 2021).
4. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. Target product profile analysis of COVID-19 vaccines in phase III clinical trials and beyond: An early 2021 perspective. *Viruses* 2021 doi: 10.3390/v13030418.
5. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Comirnaty, INN-COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside-modified) - SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
6. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Spikevax, INN-COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside modified) - SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
7. Momin T, Kansagra K, Patel H, et al. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine* 2021 doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101020.
8. Precision Vaccinations-ZyCoV-D COVID-19 Vaccine. <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/zycov-d-covid-19-vaccine> (ultimo accesso: agosto 2021).
9. BBC News - Zydus Cadila: India approves world's first DNA Covid vaccine. <https://www.bbc.com/news/world-asia-india-57774294> (ultimo accesso: agosto 2021).
10. Quartz India - What we know about ZyCoV-D, the world's first DNA Covid vaccine. <https://qz.com/india/2050714/what-we-know-about-zycov-d-the-worlds-first-dna-covid-vaccine/> (ultimo accesso: agosto 2021).
11. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Vaxzevria, COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S (recombinant)) - Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
12. CanSinoBIO, <http://www.cansinotech.com/html/179/180/651.html> (ultimo accesso: luglio 2021).

13. McDougall Scientific. 2021 COVID-19 Vaccines - Summary, updates & status. <https://www.mcdougallscientific.com/wp-content/uploads/2021-Covid-19-Vaccine-and-Clinical-Trials-Update.pdf> (ultimo accesso: luglio 2021).
14. U.S. National Library of Medicine. Study of the Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of 'EpiVacCorona' Vaccine for the Prevention of COVID-19. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04527575> (ultimo accesso: luglio 2021).
15. Clinical Study of Recombinant Novel Coronavirus Vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085> (ultimo accesso: luglio 2021).
16. MesVaccins.net - ABDALA - CIGB-66 COVID-19 Vaccine, https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/718-abdala-cigb-66-covid-19-vaccine#vaccin_posologie (ultimo accesso: luglio 2021).
17. Szu-Min H, Liu M-C, Chen Y-H, et al. Safety and Immunogenicity of CpG 1018 and Aluminium Hydroxide-Adjuvanted SARS-CoV-2 S-2P Protein Vaccine MVC-COV1901: A Large-Scale Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. medRxiv 2021doi: 10.1101/2021.08.05.21261532.
18. Xia S, Zhang Y, Wang Y, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21:39–51.
19. Chinese Clinical Trial Register (ChiCTR) - The world health organization international clinical trials registered organization registered platform. <http://www.chictr.org.cn/showprojen.aspx?proj=53003> (ultimo accesso: luglio 2021).
20. World Health Organization Strategic Advisory Group of Experts (SAGE). Evidence Assessment: Sinopharm/BBIBP COVID-19 vaccine. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/sage/2021/april/2_sage29apr2021_critical-evidence_sinopharm.pdf. (ultimo accesso: Agosto 2021).
21. ClinicalTrials.gov - Efficacy, Safety and Immunogenicity of Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines (Vero Cell) to Prevent COVID-19 in Healthy Adult Population In Peru Healthy Adult Population In Peru. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04612972> (ultimo accesso: luglio 2021).
22. Precision Vaccinations - Sinopharm COVID-19 Vaccine (BBIBP-CorV). <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/sinopharm-covid-19-vaccine-bbibp-corv> (ultimo accesso: luglio 2021).
23. World Health Organization. Background document on the inactivated vaccine Sinovac-CoronaVac against COVID-19. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019> (ultimo accesso: maggio 2021).
24. World Health Organization. Interim recommendations for use of the inactivated COVID-19 vaccine, CoronaVac, developed by Sinovac Interim guidance. <https://www.who.int/groups/strategic-advisory-group-of-experts-on-immunization/covid-19-materials> (ultimo accesso: maggio 2021).
25. Reuters - Sinopharm's Wuhan unit reports 72.5% efficacy for COVID shot, seeks approval in China. <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-vaccine-sinopharm-idUSKBN2A00WW> (ultimo accesso: luglio 2021).
26. Covid-19 Vaccine Tracker: Latest Updates - The New York Times. <https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html> (ultimo accesso: agosto 2021).
27. Ella R, Reddy S, Blackwelder W, et al. Efficacy, safety, and lot to lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine 1 (BBV152): a, double-blind, randomised, controlled phase 3 trial 2. medRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.06.30.21259439.
28. ClinicalTrials.gov - Immunogenicity, Efficacy and Safety of QazCovid-in® COVID-19 Vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04691908> (ultimo accesso: luglio 2021).
29. ClinicalTrials.gov-Reactogenicity, Safety and Immunogenicity of QazCoVac-P COVID-19 Vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04930003?term=vaccine&recrs=adf&cond=COVID19&phase=0123&sort=nwst&draw=2> (ultimo accesso: luglio 2021).
30. Liu J, Huang B, Li G, et al. Immunogenicity and Safety of a SARS-CoV-2 Inactivated Vaccine (KCONVAC) in 1 Healthy Adults: Two Randomized, Double-blind, and Placebo-controlled Phase 1/2 2 Clinical Trials 3 4 Hongxing Pan Background The significant morbidity and mortality resulted from the infection of a severe acute. medRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.04.07.21253850.
31. EurekAlert Science News - A new hope: A novel vaccine against COVID-19 is safe and induces antibody production. https://www.eurekalert.org/pub_releases/2021-06/cc-anh060721.php (ultimo accesso: luglio 2021).
32. Iranian Registry of Clinical Trials. A double-blind, randomized, placebo-controlled Phase II/III Clinical trial to evaluate the safety and efficacy of COVID-19 inactivated vaccine (Shifa-Pharmed) in a population aged 18 to 75 years. <https://en.irct.ir/trial/54881> (ultimo accesso: luglio 2021).
33. Russia's CoviVac (КовиВак) more than 80% effective against COVID-19. <https://www.seminaronly.com/news/russias-covivac-ковивак-more-than-80-effective-against-covid-19/> (ultimo accesso: luglio 2021).
34. Flanagan KL, Best E, Crawford NW, et al. Progress and pitfalls in the quest for effective SARS-CoV-2 (COVID-19) vaccines. *Front Immunol* 2020;11:579250.
35. Jin Y, Yang H, Ji W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses* 2020;12:372.
36. Iba T, Levy JH, Connors JM, et al. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit Care* 2020;24:1-8.
37. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, et al. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host-virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem Neurosci* 2020;11:995–8.
38. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004;203:631-7.
39. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, et al. Renin–Angiotensin–Aldosterone system inhibitors in patients with COVID-19. *N Engl J Med* 2020;382:1653-9.
40. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare. *Biochim Clin Suppl* 3 2020;44:S28-S38.
41. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; 367(6483):1260-3.
42. Maggi E, Canonica GW, Moretta L. COVID-19: Unanswered questions on immune response and pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2020;146:18-22.
43. MK B, TP L, CB W, et al. IFCC Interim Guidelines on Serological Testing of Antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2001-8.
44. Salvatori G, Luberto L, Maffei M, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein: an optimal immunological target for vaccines. *J*

- Transl Med 2020;18:222.
45. 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.
 46. Abdulla ZA, Al-Bashir SM, Al-Salih NS, et al. A Summary of the SARS-CoV-2 Vaccines and Technologies Available or under Development. *Pathogens* 2021;10:788.
 47. COVID19 Vaccine Tracker, <https://covid19.trackvaccines.org/> (ultimo accesso: agosto 2021).
 48. The University of Queensland, Australia - Update on UQ COVID-19 vaccine - UQ News, <https://www.uq.edu.au/news/article/2020/12/update-uq-covid-19-vaccine> (ultimo accesso: giugno 2021).
 49. Medicago begins Phase I clinical trials for its COVID-19 vaccine candidate, <https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-begins-phase-i-clinical-trials-for-its-covid-19-vaccine-candidate/> (ultimo accesso: giugno 2021).
 50. ClinicalTrials.gov - BCG Vaccination to Protect Healthcare Workers Against COVID-19, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04327206> (ultimo accesso: luglio 2021).
 51. Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines* 2014;2:624-41.
 52. Sah R, Shrestha S, Mehta R, et al. AZD1222 (Covishield) vaccination for COVID-19: Experiences, challenges, and solutions in Nepal. *Travel Med Infect Dis* 2021;40:101989.
 53. Logunov DY, Dolzhikova I V., Zubkova O V., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 2020;396:887-97.
 54. Bos R, Rutten L, van der Lubbe JEM, et al. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines* 2020;5:91.
 55. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). COVID-19 Vaccine Janssen, INN-COVID-19 vaccine (Ad26.COV2-S (recombinant)) - Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-janssen-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
 56. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-Based COVID-19 vaccine candidates. *N Engl J Med* 2020;383:2439-50.
 57. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021;384:403-16.
 58. Barr JN, Fearn R. Chapter 2: Genetic Instability of RNA Viruses. In: Kovalchuk I, Kovalchuk O, ed. *Genome Stability: From Virus to Human Application*. Amsterdam: Elsevier Inc. 2016:21-35.
 59. Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2 - what do they mean? 2021;325:529-31.
 60. PANGO lineages, <https://cov-lineages.org/> (ultimo accesso: luglio 2021).
 61. GISAID - hCov19 Variants, <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/> (ultimo accesso: luglio 2021).
 62. Nextstrain, <https://nextstrain.org/sars-cov-2> (ultimo accesso: luglio 2021).
 63. Buchan SA, Tibebe S, Daneman N, et al. Increased household secondary attack rates with Variant of Concern SARS-CoV-2 index cases. *Clin Infect Dis* 2021 doi: 10.1093/CID/CIAB496.
 64. Emary KRW, Golubchik T, Aley PK, et al. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2021;397:1351-62.
 65. Wang P, Casner RG, Nair MS, et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. *bioRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.03.01.433466.
 66. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *bioRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.04.22.440932.
 67. Deng X, Garcia-Knight MA, Khalid MM, et al. Transmission, infectivity, and antibody neutralization of an emerging SARS-CoV-2 variant in California carrying a L452R spike protein mutation. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.03.07.21252647.
 68. Fact sheet for health care providers emergency use authorization (EUA) of Bamlanivimab and Etesevimab authorized use. https://www.cdc.gov/growthcharts/clinical_charts.htm (ultimo accesso: luglio 2021).
 69. Annavajhala MK, Mohri H, Zucker JE, et al. A Novel SARS-CoV-2 Variant of Concern, B.1.526, Identified in New York. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.02.23.21252259.
 70. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* 2021;29:463-76.e6.
 71. Acevedo ML, Alonso-Palomares L, Bustamante A, et al. Infectivity and immune escape of the new SARS-CoV-2 variant of interest Lambda. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.06.28.21259673.
 72. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, et al. SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *The Lancet Microbe* 2021;2:e283-e284.
 73. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 49thed. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-july-2021> (ultimo accesso: luglio 2021).
 74. Volz E, Mishra S, Chand M, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2020.12.30.20249034.
 75. Muik A, Wallisch AK, Sanger B, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science* 2021;371:1152-3.
 76. Bager P, Wohlfahrt J, Fonager J, et al. Risk of hospitalisation associated with infection with SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in Denmark: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2021 doi: 10.1016/S1473-3099(21)00290-5.
 77. Horby AP, Huntley C, Davies N, et al. NERVTAG paper on COVID-19 variant of concern B.1.1.7. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/961037/NERVTA_G_note_on_B.1.1.7_severity_for_SAGE_77__1_.pdf (ultimo accesso: agosto 2021).
 78. Li Q, Nie J, Wu J, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell* 2021;184:2362-71.e9.
 79. McCallum M, Bassi J, de Marco A, et al. SARS-CoV-2 immune evasion by the B.1.427/B.1.429 variant of concern. *Science* 2021;373:648-54.
 80. Oliveira MHS de, Lippi G, Henry BM. Sudden rise in COVID-19 case fatality among young and middle-aged adults in the south of Brazil after identification of the novel

- B.1.1.28.1 (P.1) SARS-CoV-2 strain: analysis of data from the state of Parana. medRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.03.24.21254046.
81. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. bioRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.04.22.440932.
 82. Collier DA, De Marco A, Ferreira IATM, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine-elicited antibodies. *Nature* 2021;593:136-41.
 83. Wu K, Werner AP, Moliva JI, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. bioRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.01.25.427948.
 84. Bernal JL, Andrews N, Gower C, et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against the B.1.617.2 variant. *N Engl J Med* 2021;385:585-94.
 85. Curiale S. Coronavirus: quello che c'è da sapere. https://www.inmi.it/wp-content/uploads/2021/05/coronavirus_comunicato_30_04_21_compressed.pdf (ultimo accesso: giugno 2021).
 86. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin Suppl* 3 2020;44:S8-S12.
 87. Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020;505:190-1.
 88. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1131-4.
 89. Rolla R, Vidali M, Puricelli C, et al. Reduced activity of B lymphocytes, recognised by Sysmex XN-2000TM haematology analyser, predicts mortality in patients with coronavirus disease 2019. *Int J Lab Hematol* 2020;43:e5-e8.
 90. Tang F, Quan Y, Xin Z-T, et al. Lack of peripheral memory B Cell responses in recovered patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A six-year follow-up study. *J Immunol* 2011;186:7264-8.
 91. Wu LP, Wang NC, Chang YH, et al. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1562-4.
 92. Alshukairi AN, Zhao J, Al-Mozaini MA, et al. Longevity of middle east respiratory syndrome coronavirus antibody responses in humans, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 2021;27:1472-6.
 93. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021 doi: 10.1126/science.abf4063.
 94. Lippi G, Sciacovelli L, Trenti T, et al. Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali. *Biochim Clin.* 2021;45:87-90.
 95. Lippi G, Mattiuzzi C. Clinical value of anti-SARS-COV-2 serum IgA titration in patients with COVID-19. *J Med Virol* 2021;93:1210-1.
 96. Varnaité R, García M, Glans H, et al. Expansion of SARS-CoV-2-Specific Antibody-Secreting Cells and Generation of Neutralizing Antibodies in Hospitalized COVID-19 Patients. *J Immunol* 2020;205:2437-46.
 97. Ejemel M, Li Q, Hou S, et al. A cross-reactive human IgA monoclonal antibody blocks SARS-CoV-2 spike-ACE2 interaction. *Nat Commun* 2020;11:4198.
 98. Nextstrain Team. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with global subsampling, <https://nextstrain.org/ncov/open/global> (ultimo accesso: agosto 2021).
 99. Weissman D, Alameh M-G, Silva T de, et al. D614G Spike mutation increases SARS CoV-2 susceptibility to neutralization. *Cell Host Microbe* 2021;29:23-31.
 100. World Health Organization. Genomic sequencing of SARS-CoV-2 - A guide to implementation for maximum impact on public health. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440> (ultimo accesso: giugno 2021).
 101. Becker M, Dulovic A, Junker D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals. *Nat Commun* 2021;12:1-8.
 102. Istituto Superiore di Sanità. Come funziona il monitoraggio delle varianti in Italia?, https://www.iss.it/cov19-cosa-fa-iss-varianti/-/asset_publisher/yJS4xO2faUqM/content/come-funziona-il-monitoraggio-delle-varianti-in-italia- (ultimo accesso: agosto 2021).
 103. Istituto Superiore di Sanità. Prevalenza e distribuzione delle varianti del virus SARS-CoV-2 di interesse per la sanità pubblica in Italia. Rapporto n. 5 del 23 luglio 2021. <https://www.iss.it/documents/20126/0/VERSIONE+H++17+B+OLLETTINO+VARIANTI+n.5+23+luglio.pdf/e3a41bf9-0913-a01b-6b5d-5b55c249e0d7?e=1627050956399> (ultimo accesso: agosto 2021).
 104. Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, et al. Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021;384:2092-101.
 105. Schultz NH, Sørvoll IH, Michelsen AE, et al. Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021;384:2124-30.
 106. Sadoff J, Davis K, Douoguih M. Thrombotic thrombocytopenia after Ad26.COV2.S Vaccination — Response from the Manufacturer. *N Engl J Med* 2021;384:1965-6.
 107. European Medicines Agency. EudraVigilance: electronic reporting. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/pharmacovigilance/eudravigilance/eudravigilance-electronic-reporting> (ultimo accesso: giugno 2021).
 108. Lee EJ, Cines DB, Gernsheimer T, et al. Thrombocytopenia following Pfizer and Moderna SARS-CoV-2 vaccination. *Am J Hematol* 2021;96:534-7.
 109. Tsilingiris D, Vallianou NG, Karampela I, et al. Vaccine induced thrombotic thrombocytopenia: The shady chapter of a success story. *Metab Open* 2021 doi: 10.1016/j.metop.2021.100101.
 110. Greinacher A, Handtke S, Lalk M, et al. Towards understanding ChAdOx1 nCov-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT). *Research Square* 2021 doi: 10.21203/rs.3.rs-440461/v1.
 111. Kowarz E, Krutzke L, Reis J, et al. 'Vaccine-Induced Covid-19 Mimicry' Syndrome: Splice reactions within the SARS-CoV-2 Spike open reading frame result in Spike protein variants that may cause thromboembolic events in patients immunized with vector-based vaccines. *Research Square* 2021 doi: 10.21203/rs.3.rs-558954/v1.
 112. Arepally GM, Ortel TL. Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT): What we know and don't know. *Blood* 2021;138:293-8.
 113. Gresele P, Marietta M, Ageno W, et al. Management of cerebral and splanchnic vein thrombosis associated with thrombocytopenia in subjects previously vaccinated with Vaxzevria (AstraZeneca): a position statement from the Italian Society for the Study of Haemostasis and Thrombosis (SISST). *Blood Transfus* 2021;19:281-3.
 114. International Society on Thrombosis and Haemostasis. ISTH Interim guidance for the diagnosis and treatment on vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. <https://www.isth.org/news/561406/The-ISTH-Releases-Interim-Guidance-on-Vaccine-Induced-Immune-Thrombotic-Thrombocytopenia-VITT-.htm> (ultimo accesso: luglio 2021).

115. Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi. Diagnosi e terapia della trombocitopenia eparina indotta. Perugia: Siset, 2010. <http://www.siset.org/linee-guida/linee-guida-siset> (ultimo accesso: giugno 2021).

Measurement of biotinidase activity using dried blood spots by a spectrophotometric assay

Mamoun Ahram¹, Mohammad Aladawi^{2,3}, Omar Dwekat², Louay Zaghlo², Suzan Al Bdour¹, Amira Masri⁴

¹Department of Physiology and Biochemistry, School of Medicine, The University of Jordan, Amman, Jordan

²School of Medicine, The University of Jordan, Amman, Jordan

³Department of Neurological Sciences, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

⁴Department of Pediatrics, School of Medicine, The University of Jordan, Amman, Jordan

ABSTRACT

Assay for biotinidase activity.

Introduction: biotinidase is required for biotin recycling; its deficiency results in loss of this coenzyme and, hence, the function of many critical enzymes. Delay in the diagnosis of biotinidase deficiency causes irreversible neurological damage; however, it is completely reversible and treatable if detected early. The aim of this study is to measure the activity of the biotinidase enzyme in dried blood specimens using a spectrophotometric technique.

Methods: dried blood specimens were collected from adults (n=81), neonates (n=50), as well as from a patient and his two siblings. A microplate-based enzyme kinetics assay was implemented to assess enzyme stability and activity using N-biotinyl-p-aminobenzoate as a substrate.

Results: the enzyme was found to be stable for 28 days in dried blood spots stored at -20 °C. The assay was effective in measuring similar activities of biotinidase among healthy adults and neonates. On the other hand, no biotinidase activity was detected in the patient and low activity was measured in his two siblings.

Conclusion: the assay provides a cost-effective method for the early detection of biotinidase deficiency.

Key words: biotinidase, dried blood spot, neonatal screening

INTRODUCTION

Biotin is a water-soluble crucial vitamin coenzyme needed for functional activity of carboxylases in mammals (1). Biotin serves as a coenzyme for critical enzymes involved in the metabolism of carbohydrates and lipids such as pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylases α and β , propionyl-CoA carboxylase, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (2). The human small intestine has a couple of sources for biotin: the normal bacterial flora of the large intestine, and the diet (3). Biotinidase is an enzyme that recycles biotin from biocytin, a complex formed by the fusion of biotin with carboxylase enzymes via the amino acid lysine (4).

Biotinidase deficiency is an autosomal recessive inherited disease. The symptoms are numerous: skin rash, hair loss, conjunctival inflammation, ataxia, developmental delay, and candidiasis (5,6). More than

70% of clinically affected children demonstrate clinical features of the disease before diagnosis and treatment (7). About half of the children exhibit neurological features such as developmental delay, visual problems, and ataxia (6). Biochemically, patients may show evidence of organic aciduria and ketolactic acidosis caused by undersupplied activities of the biotin-dependent carboxylase enzymes (8). Infants missing biotinidase activity are incapable of recycling biotin and, therefore, they rely completely upon exogenous biotin administration.

The incidence of the disease is approximately 1 in 60 000 people (5). A pilot study conducted in Turkey indicated that the incidence of biotinidase deficiency (1:11 000) was higher than in other Countries (9). There is no available information about the incidence of biotinidase deficiency in Jordan, as the screening for biotinidase deficiency is not currently implemented within

Corresponding Author: Mamoun Ahram, Ph.D., Department of Physiology and Biochemistry, School of Medicine, The University of Jordan, Amman 11942, Jordan, E-mail m.ahram@ju.edu.jo; Dr.Ahram@gmail.com

Received: 29.03.2021

Revised: 24.05.2021

Accepted: 01.06.2021

Published on-line: 02.08.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.047

the national Jordanian neonatal screening program. However, due to the high rate of consanguineous marriages in Jordan (10), the incidence of autosomal recessive disorders including neurometabolic disorders are not uncommon (11,12). Countries like France that do not have a screening program for the disease, report more symptomatic cases of biotinidase deficiency in comparison to Countries that have regular screening for it, and therefore the inclusion of a screening program for biotinidase deficiency is recommended (13). The aim of this study is to set up a biochemical assay based on the biotinidase activity measurement in dried blood spots.

METHODS

Informed consent was obtained from all the adult subjects and the parents of the neonates enrolled in this study. The clinical diagnosis was made at the Pediatric Ward, Jordan University Hospital (JUH). The study was approved by the JUH Institutional Review Board (IRB) of and the Deanship of Academic Research, The University of Jordan. All investigators had read and complied with the mandatory ethical guidelines provided by JUH, which are based on the World Medical Association Declaration of Helsinki, as amended in 2013.

Subjects

Control group

Adult. A total of 81 dried, blood specimens from healthy adult Jordanian subjects with no previous history of enzyme deficiency were collected and included as negative controls. The cohort was composed of 52 females and 29 males with a median age of 40 years (range: 18-78). The samples have been collected between January and September 2018. A total of 10 dried, blood specimens of healthy adult Jordanian subjects were collected on the same day and stored for different times, in order to analyze enzyme stability.

Neonates. Dried, blood specimens were collected from 50 neonates at the Nursery Department, JUH, over the same period of the study. All neonates were newborn (1 day-old) and had liver enzymes within the reference range.

Patients

Three male siblings of 11, 14, and 16 years who attended the Pediatric Clinic at JUH were enrolled in the study. The elder one had been diagnosed with biotinidase deficiency and the other two were of unknown diagnosis since they started biotin supplementation immediately after birth. Importantly, none of them were taking any primary aromatic amines including drugs such as sulfonamide, which reduces the enzyme's activity.

Samples

Specimens from the adult individuals and the three

siblings were collected by dripping blood from their fingers onto filter papers. Newborn specimens were collected by impregnating filter papers with blood from the heel of the babies. Filter papers were dried for several hours and were immediately processed for assay or stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The filter papers were protected from moisture and condensation by storing them in sealed plastic bags.

For the assay, discs (5-mm diameter) from dried blood spots were punched out from the filter papers.

Reagents

N-biotinyl-p-aminobenzoate (B-PAB), p-aminobenzoate (PAB), potassium phosphate buffer (pH 6), trichloroacetic acid (TCA), and ammonium sulfamate were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim am Albuch, Germany); ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from Fluka AG (Buchs, Switzerland); sodium nitrite was purchased from Arizona Chemicals (Mässvågen, Sweden); N-1 naphthylethylenediamine dihydrochloride was obtained from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). The stock solution and the working solution of phosphate buffer were 500 mM and 50 mM, respectively. The stock solution and the working solution of EDTA were 50 mM and 5 mM, respectively.

Procedure

The enzyme assay was based on the method described previously by Yamaguchi et al. with some modification (14). The biochemical reaction involves the production of a purple coloration resulting from PAB that is enzymatically released from B-PAB by biotinidase. Briefly, 17 μL of 15 mM B-PAB, 100 μL of 500 mM phosphate buffer, 100 μL of 50 mM EDTA, and 783 μL of distilled water were added to a 1.5-mL microcentrifuge tube to obtain a 1 mL mixture. Then, 30 μL of this mixture was added to each disc in a 96-well plate. The microplate was covered and incubated without shaking for 16 hours at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction was terminated by adding 50 μL of 1.84 M TCA for 10 minutes. 50 μL aliquots were then transferred to a flat-bottomed microplate. For the coupling reaction, 50 μL of each of the following freshly-prepared reagents were added sequentially at 3-minute intervals: 14.5 mM sodium nitrite, 43.8 mM ammonium sulfamate, and 3.86 mM N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride. After 10 min, the absorbance was measured at 540 nm using Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

The biotinidase activity was calculated using calibration curves of standard solutions of PAB with a range concentration of 25 to 1600 μM PAB. The solutions were the same as those prepared for the substrate solution minus the substrate (B-PAB). 30 μL of the standard solution, 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), and 5 mM EDTA were added to the U-bottomed microplate wells. 60 μL of 1,600 μM PAB were added to the first well. Then, 30 μL of phosphate-EDTA buffer mixture was added to the rest of the wells. The standard

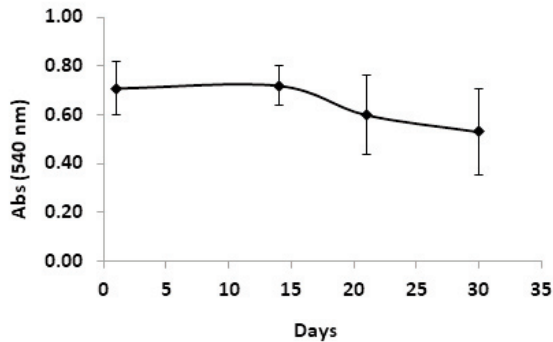


Figure 1
Stability of biotinidase activity after storage of dried spots from 10 different adult individuals at -20 °C for various time periods. Each point represents the average of the absorbance readings (\pm standard deviation) of the 10 samples.

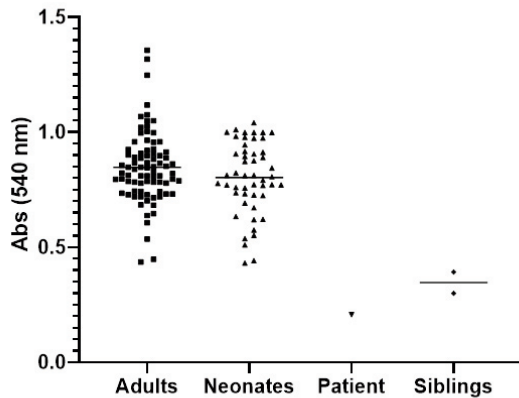


Figure 2
Assay of biotinidase activity among healthy adults, neonates, one patient, and his siblings. The horizontal lines represent the averages of the absorbance readings per group.

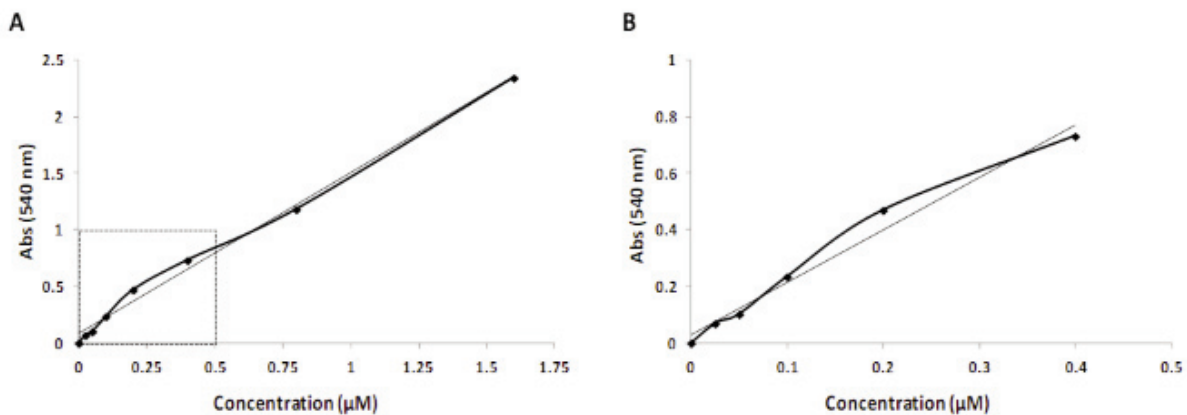


Figure 3
Standard curve of PAB at different concentrations. The insert in (A) is shown enlarged in (B). The black line represents the actual readings, the gray line represents the trendline with a R^2 of 99.3 for (A) and R^2 of 98.0 for (B).

was diluted serially by transferring 30 μ L from the 1,600- μ M PAB well to the consecutive wells and mixing them properly. The dilution was ended after 6 transfer steps by discarding 30 μ L from the 7th well. This serial dilution yielded the following quantities: 1600, 800, 400, 200, 100, 50, and 25 μ M PAB. The negative control was identical to that described above but without the incubation time.

RESULTS

The stability of biotinidase activity at different storage times was first analyzed. Ten dried samples from healthy, adult individuals were tested on the same day of the collection, then 14, 21, and 28 days later. Figure 1 shows that the average of enzyme activity in the 10 samples remained constant for the first 2 weeks, but slightly declined with longer storage time. 15% and 25% decrease after 3 and 4 weeks of storage, respectively were observed. In addition, the range of the enzyme activity increased with longer storage time. Nevertheless, the enzyme activity is detectable and can still be measured 28 days after the collection of samples.

The activity of biotinidase was then measured in dried blood spots collected from 81 healthy, adult individuals (Figure 2). The range of absorbance were 0.44-1.36 (mean 0.86), which corresponded to a range of enzyme activity of 0.19-1.14 μ M (mean 0.62) of product formed per minute, respectively, based on the substrate standard curve (Figure 3). The same was done for the samples collected from 50 neonates. The range of absorbance was measured to be 0.43-1.04 with an average of (mean 0.8) corresponding to an enzyme activity 0.18-0.82 μ M (mean 0.57 μ M) of product formed per minute, respectively. These values were similar to the range and mean enzyme activity measured among adults. The enzyme activity of the patients and the two siblings is shown in Figure 2. According to the standard curve, no activity of biotinidase was detected in the

patient (Figure 2). On the other hand, his two siblings had a decreased enzyme activity with absorbance readings of 0.3 (0.050 μM product/minute) and 0.39 (0.14 μM product/minute), which were lower than the lowest values measured in healthy adults.

DISCUSSION

The assay here illustrated shows a simple and feasible method to measure the biotinidase activity in dried blood spots in both adults and neonates. It is important to note that the purpose of this work is to implement the assay and assess its feasibility but it was not a validation study which has been reported earlier (14). Compared to other similar studies, our assay can be performed in a shorter time and with less effort, making it more convenient and applicable for routine screening for biotinidase deficiency in neonates. Although newer more accurate screening tests such as fluorometric assay and genetic testing were developed, we used a spectrophotometric assay that is more cost-effective and can be performed using dried blood samples collected for other neonatal screening tests (15,16).

In normal individuals, the biotinidase enzyme function is to extract biotin from biotin-bound proteins and to recycle it from biocytin making it available for various metabolic functions and processes (2,17). One of the permanent consequences of biotinidase deficiency is irreversible neurological deficits. Our study measured the enzyme activity of three siblings: one of these has already been diagnosed with biotinidase deficiency. The patient's younger siblings are prophylactically treated with biotin alongside their older affected brother. According to the recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics, an individual showing a biotinidase activity less than 10% of the mean of normal individuals is to be classified as having a profound deficiency, whereas those with an enzyme activity between 10–30% the mean of normal individuals are classified as partial deficient. Obligate heterozygotes show approximately 50% of enzyme activity (18). One of the two siblings has an activity 24% lower than the mean activity of the normal population suggesting partial biotinidase deficiency; the other one can be classified as heterozygote showing an activity of 38%. It would be worthwhile to perform a genetic testing of this family to check for mutations of the involved gene(s). It would also be interesting to test individuals with low biotinidase activity among the study cohort for genetic variants such as polymorphisms that may reduce the enzyme activity.

Although it is recommended that the assay is conducted within 14 days of sample collection provided that the samples are stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, it is worth noting that enzyme activity could be detected even 28 days after sample collection (even if at lower concentrations). The relative stability of biotinidase activity is an useful information as busy screening centers might be unable to process samples in a timely manner. It is also

recommended that, when testing for biotinidase activity in patients or individuals suspected to be affected, samples from healthy individuals are collected and tested simultaneously to ensure proper handling and assaying of samples (18). The assay is a cost-effective method for the early detection of the enzyme deficit and the prevention of irreversible consequences, easily achievable by oral biotin administration, which is an excellent long-term solution to prevent physical and cognitive damage with excellent compliance to treatment (19,20). Meanwhile, unneeded administration of biotin to unaffected individuals can be stopped. The assay can be easily adopted in hospitals performing neonatal screening for other metabolic diseases such as phenylketonuria (PKU) since the assay can be applied using the same dried blood sample. The test is useful for the community since it detects early enzyme deficiency and can be considered a test to be included in screening programs providing reliable information about the incidence of this disorder in Jordan.

FUNDING

This study was funded by the Deanship of Scientific Research at the University of Jordan.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev of Endocrinol Metab* 2008;3:715-24.
2. Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Ann Rev Nutrition* 1997;17:77-99.
3. Combs Jr GF, McClung JP. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 5th ed. Academic Press; 2016.
4. Wolf B, Heard GS, McVoy JR, et al. Biotinidase deficiency: the possible role of biotinidase in the processing of dietary protein-bound biotin. *J Inherited Metabol Dis* 1984;7 Suppl 2:121-2.
5. Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherited Metabol Dis* 1991;14:923-7.
6. Wolf B, Feldman GL. The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am J Hum Genet* 1982;34:699-716.
7. Salbert BA, Astruc J, Wolf B. Ophthalmologic findings in biotinidase deficiency. *Ophthalmologica* 1993;206:177-81.
8. Pomponio RJ, Ozand PT, Al Essa M, et al. Novel mutations in children with profound biotinidase deficiency from Saudi Arabia. *J Inherited Metabol Dis* 2000;23:185-7.
9. Baykal T, Huner G, Sarbat G, et al. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns. *Acta paediatrica* 1998;87:1102-3.
10. Hamamy HA, Masri AT, Al-Hadidy AM, et al. Consanguinity and genetic disorders. Profile from Jordan. *Saudi Med J* 2007;28:1015-7.
11. Masri A, Wahsh SA. Manifestations and treatment of epilepsy in children with neurometabolic disorders: a series from Jordan. *Seizure* 2014;23:10-5.

12. Masri A, Hamamy H, Khreisat A. Profile of developmental delay in children under five years of age in a highly consanguineous community: a hospital-based study-Jordan. *Brain Dev* 2011;33:810-5.
13. Deschamps R, Stankoff B, Vignal C, et al. Are we missing patients with biotinidase deficiency in France? *Rev Neurol (Paris)* 2018;174:273-4.
14. Yamaguchi A, Fukushi M, Arai O, et al. A simple method for quantification of biotinidase activity in dried blood spot and its application to screening of biotinidase deficiency. *The Tohoku J Exp Med* 1987;152:339-46.
15. Heard GS, Secor McVoy JR, et al. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem* 1984;30:125-7.
16. Işeri-Erten SÖ, Dikmen ZG, Ulusu NN. Comparison of spectrophotometric and fluorimetric methods in evaluation of biotinidase deficiency. *J Med Biochem* 2016;35:123-9.
17. Zempleni J, Wijeratne SS, Hassan YI. Biotin. *Biofactors* 2009;35:36-46.
18. Strovel ET, Cowan TM, Scott AI, et al. Wolf B. Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017 doi: 10.1038/gim.2017.84.
19. Wolf B. Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genet Med* 2016;19:396-402.
20. Jay AM, Conway RL, Feldman GL, et al. Outcomes of individuals with profound and partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening in Michigan over 25 years. *Genet Med* 2014;17:205-9.

Screening tossicologico su matrice pilifera: verifica delle prestazioni analitiche secondo lo standard internazionale ISO 15189

Maria Stornaiuolo¹, Mariela Marinova¹, Carlo Artusi¹, Martina Zaninotto¹, Mario Plebani^{1,2}

¹UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università Padova

²Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS) Servizi di Diagnostica Integrata

Questo contributo è stato 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

Hair drug screening test for illegal drugs: method verification according to ISO 15189 standard.

Introduction: hair testing is an alternative matrix for diagnosis and monitoring of drug misuse. The aim of the present study was to evaluate the analytical performances of 7 semi-quantitative immunoassays using hair specimens according to the ISO 15189 standard, in order to introduce hair drug screening in our practice.

Methods: QuantILab DRI Cocaine Metabolite, Opiate, Cannabinoid, Methadone, Amphetamines, Ecstasy and Immunalysis Buprenorphine, were applied on Ilab Taurus (Instrumentation Laboratory SpA, a Werfen Company, Milano). The imprecision verification study consisted in calculating the within-laboratory imprecision (S_{WL}) using positive quality control hair materials, followed by assessment of uniformity with manufacturer's inter-assay claims and acceptability of test results. A total of 25 EQAS and 29 hair specimens were tested to verify the diagnostic sensitivity (SE_{LAB}) and specificity (SP_{LAB}). To confirm the results, an UPLC-MS/MS method accredited according to ISO 15189 standard was used.

Results: S_{WL} obtained for 3 assays were lower than those specified by the manufacturer, opposed to Cannabinoid, Amphetamines, Buprenorphine and Ecstasy assays; thus Upper Verification Limit (UVL) were calculated. S_{WL} for Cannabinoid, Amphetamines and Buprenorphine assays were lower than UVL; Ecstasy assay S_{WL} (8.40%) was greater than UVL (8.39%), but still lower than state-of-the-art imprecision (<15%). SE_{LAB} and SP_{LAB} were 100% for all assays except SP_{LAB} for Cannabinoid (95.2%) and Amphetamines (92.9%); 95% confidence intervals of manufacturer diagnostic specificity (SP_{PROD}) were calculated. SP_{LAB} for both assays were included in the 95% CI of SP_{PROD} .

Discussion: for all immunoassays, the verifications were successful and exhibit good diagnostic efficiency for hair drug screening.

Parole chiave: screening sostanze d'abuso, matrice pilifera, verifica analitica

INTRODUZIONE

La diffusione dell'uso e dell'abuso di sostanze stupefacenti ha comportato un notevole incremento della richiesta della loro determinazione in varie matrici biologiche, a cui è assegnato non soltanto un significato clinico-terapeutico ma anche una rilevanza giuridica e sociale. Il laboratorio di tossicologia clinica trova il suo campo di applicazione in due principali settori di

intervento. Il primo riguarda le attività di diagnosi e trattamento finalizzate al reinserimento socio lavorativo dei tossicodipendenti; in questo caso la diagnostica di laboratorio riveste un ruolo fondamentale consentendo di verificare in modo oggettivo l'andamento della terapia sostitutiva o l'uso, abuso o misuse di sostanze stupefacenti protratto nel tempo. Il secondo riguarda analisi per scopi amministrativi o medico-legali le cui richieste possono pervenire da parte di enti pubblici e/o

Corrispondenza a: Maria Stornaiuolo, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università Padova, E-mail maria.stornaiuolo@aopd.veneto.it

Ricevuto: 31.03.2021

Revisionato: 24.05.2021

Accettato: 01.06.2021

Publicato on-line: 28.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.045

privati per accertamenti sui lavoratori le cui mansioni comportano rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi. A titolo di esempio si possono citare: forze dell'ordine per accertamenti dello stato di ebbrezza o dell'assunzione di sostanze stupefacenti alla guida; Commissioni Medico Locali per il rilascio delle patenti di guida, la determinazione dei requisiti psicofisici per il rilascio del porto d'armi ed altro. Pertanto, la garanzia della qualità delle analisi eseguite è indispensabile per assicurare la massima accuratezza dei risultati relativi alle prestazioni erogate (1).

La ricerca delle sostanze stupefacenti può essere condotta su diverse matrici biologiche, la cui scelta è strettamente correlata alla finalità dell'esame. È ormai noto da tempo che le sostanze stupefacenti e i loro metaboliti si incorporano nella matrice pilifera durante il processo metabolico. L'analisi della matrice pilifera permette un'indagine retrospettiva sull'uso, anche saltuario, di droghe, poiché offre la possibilità di ricostruire in modo preciso l'andamento temporale delle assunzioni della sostanza d'abuso da parte del soggetto (2). Infatti, se questa finestra di rilevabilità è solo di ore nel caso del sangue, diventa di alcuni giorni nel caso dell'urina e di mesi nel caso dei capelli (1).

L'evoluzione del monitoraggio clinico dei soggetti con problemi di dipendenza da sostanze ha reso necessario l'impiego di soluzioni rapide ed efficienti in grado di facilitare l'adesione clinica. L'utilizzo del metodo immunoenzimatico su matrice pilifera risponde pienamente alle necessità sopra elencate (3). Poiché la velocità di crescita del capello in fase anagenica è di circa 1 cm/mese, l'analisi segmentale per centimetro di capello estende la finestra temporale di rilevabilità di una determinata sostanza in tale matrice fornendo informazioni riguardanti il comportamento pregresso di abuso, la storia e la tipologia di consumo in ognuno dei mesi corrispondenti al segmento analizzato; queste informazioni non sarebbero disponibili attraverso l'analisi di altre matrici biologiche (2). Inoltre, uno studio multicentrico nazionale ha evidenziato i vantaggi dell'introduzione del test immunoenzimatico su matrice pilifera sull'organizzazione del lavoro e sulla fruibilità dei servizi offerti agli utenti dei Servizi per le Dipendenze patologiche (Ser.D) determinando così un miglioramento dei processi di gestione delle risorse umane ed economiche (4). Ulteriori vantaggi riguardano:

- la qualità del campione esaminato, che è più difficilmente adulterabile;
- la possibilità di ridurre la frequenza di raccolta dei campioni e dunque il numero di accessi al servizio da parte dell'utenza;
- la minore invasività dell'indagine e la disponibilità di una determinazione semi-quantitativa che permetta di valutare, in relazione alla lunghezza dei capelli, l'uso pregresso di sostanze d'abuso. In caso di positività, il dato semi-quantitativo ottenuto riportato in associazione ad un intervallo di concentrazione permette di monitorare il soggetto nel tempo. Tale metodica permette inoltre di ottenere una notevole riduzione della spesa complessiva delle attività di

monitoraggio tossicologico poiché le tempistiche di ripetizione dell'esame si ridurrebbero rispetto a quelle dello screening su matrice urinaria (4).

L'implementazione della diagnostica di screening delle sostanze d'abuso su matrice pilifera presso la Unità Operativa Complessa di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova nasce in seguito al coinvolgimento del laboratorio nella riorganizzazione delle attività di monitoraggio tossicologico dei Ser.D del Dipartimento Dipendenze dell'ULSS6. Pertanto, l'affidabilità dei risultati prodotti e la riduzione del margine di errore sono requisiti fondamentali nella diagnostica di laboratorio che non possono prescindere dalla realizzazione di un attento sistema di gestione di qualità. La norma UNI EN ISO 15189:2012 "Laboratori medici – Requisiti particolari riguardanti la qualità e la competenza" (5) è considerata, a livello internazionale, il riferimento per il sistema di gestione della qualità dei laboratori medici. Tale norma prevede la verifica di tutte le procedure di esame validate dal produttore (metodi CE-IVD), prima della loro introduzione nella pratica clinica diagnostica di routine. La procedura di verifica deve dimostrare che il laboratorio è in grado di operare con le specifiche di prestazione dichiarate dal produttore o che le caratteristiche di prestazione ottenute siano idonee allo scopo d'uso della procedura di esame.

In accordo ai requisiti richiesti dalla norma UNI EN ISO 15189:2012, l'obiettivo di questo lavoro è la verifica delle prestazioni analitiche dichiarate dal produttore, in termini di imprecisione intra-laboratorio, sensibilità e specificità diagnostica, di sette metodi immunoenzimatici semi-quantitativi al fine di introdurre lo screening tossicologico su matrice pilifera nella pratica clinica routinaria.

METODI

Per tutti gli analiti, i metodi (reagenti Comedical e reagenti quantLab) sono stati validati CE dal produttore sulla piattaforma automatizzata Ilab™ TAURUS (Instrumentation Laboratory SpA, a Werfen Company, Milano). Tutti i campioni di matrice pilifera sono stati sottoposti ad una procedura di preparazione utilizzando la linea VMA-T (Comedical s.r.l., Trento, Italia) costituita da soluzione di lavaggio SLV-VMA-T, reattivo di estrazione VMA-T, calibratori e controlli. L'accettabilità della seduta analitica, è stata verificata tramite l'utilizzo di controlli di qualità interni TricoCheck® Screening (Comedical s.r.l., Trento, Italia), interamente realizzati con campioni piliferi: CTRL-T NEG, CTRL-T POS CONTROL (per le classi degli oppiacei, cocaina e metadone), CTRL-T AMF CONTROL (per le classi delle amfetamine ed ecstasy), CTRL-T THC CONTROL (per la classe di cannabinoidi), CTRL-T BUP CONTROL (per la buprenorfina e suoi metaboliti). Per la verifica dell'imprecisione intra-laboratorio, espressa in termini di coefficiente di variazione percentuale (CV%), è stato utilizzato un controllo positivo contenente tutte le classi di analiti oggetto di verifica: TricoCheck® Screening

CTRL-T I 18 (Comedical s.r.l., Trento, Italia). La valutazione del limite di bianco è stata eseguita utilizzando il controllo negativo CTRL-T NEG. La valutazione dell'accuratezza diagnostica, in termini di sensibilità e specificità, è stata effettuata su un totale di 25 campioni di valutazione esterna di qualità (LGC Standards Proficiency testing) e 29 campioni piliferi della routine del laboratorio.

Preparazione dei campioni

I campioni di matrice pilifera sono posti in un apposito barattolo e sminuzzati con forbici fino ad ottenere piccoli frammenti di circa 2-3 mm di lunghezza. Con l'ausilio di una pinzetta, (precedentemente lavata con una piccola quantità di alcool denaturato ed acqua distillata, ed accuratamente asciugata) un'aliquota di campione compresa tra 32-34 mg, viene prelevata e pesata in provetta di vetro con tappo a chiusura ermetica. Per escludere la possibilità di contaminazioni ambientali che potrebbero creare interferenze a livello analitico, e garantire che eventuali risultati positivi derivino esclusivamente dall'effettiva assunzione delle sostanze in esame, ogni campione è sottoposto ad una procedura di lavaggio. Pertanto, 1 mL di soluzione di lavaggio è aggiunto alla provetta contenente il campione, che viene mescolato delicatamente per circa 30 secondi, e successivamente la soluzione viene eliminata. Terminata l'operazione di lavaggio, 400 mL di reattivo di estrazione sono aggiunti alla provetta contenente il campione; la digestione è eseguita per un'ora a 100 °C. Al termine del processo di estrazione, il campione viene raffreddato a temperatura ambiente, centrifugato 5 minuti a 3 000 g e il surnatante posto in provetta per l'esecuzione dell'esame di screening immunometrico.

Metodi analitici

Per la determinazione di amfetamine, ecstasy, oppiacei, cocaina, metadone e cannabinoidi è stata utilizzata la tecnologia dell'immunodosaggio enzimatico in fase omogenea utilizzando la linea di reattivi quantiLab® (Instrumentation Laboratory SpA a Werfen Company, Milano) e HEIA™ (Immunalysis Corporation, Pomona, CA, USA) per la buprenorfina. Tutti i metodi sono basati sulla competizione tra la sostanza stupefacente, marcata con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), capace di trasformare il NAD⁺ in NADH in presenza del substrato glucosio-6-fosfato (G6P) e la sostanza d'abuso contenuta nel campione, per un numero fisso di siti di legame anticorpale. In assenza di sostanza libera nel campione, l'anticorpo specifico si lega allo stupefacente marcato con l'enzima e l'attività enzimatica risulta inibita. Questo fenomeno crea una correlazione diretta tra la concentrazione di analita nel campione e l'attività dell'enzima G6PDH. L'attività enzimatica è determinata spettrofotometricamente a 340 nm dalla riduzione del NAD⁺ a NADH. L'incremento della assorbanza a 340 nm (aumento di

NADH) è correlato alla concentrazione della sostanza ricercata nel campione.

Valutazione dell'imprecisione intra-laboratorio e limite di bianco

La valutazione della precisione analitica è stata eseguita in accordo al protocollo CLSI-EP15/A3 (6). In considerazione del procedimento tecnicamente laborioso è stata eseguita una versione ridotta di tale protocollo che ha previsto una riduzione del numero di replicati. Inoltre, a causa della difficoltà di reperimento di materiale adeguato, l'imprecisione intra-laboratorio è stata valutata ad un solo livello di concentrazione (questo rappresenta un limite dello studio). Il materiale di controllo positivo è stato analizzato in triplicato, 1 volta al giorno per 5 giorni (3x5) dove per triplicato si intendono aliquote dello stesso campione pesate ed estratte come fossero 3 campioni indipendenti. La verifica della presenza di dati aberranti è stata effettuata tramite il test statistico di Grubbs come citato dal documento SIBioC "Protocollo operativo per la verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche" a cura di Vidali, et al. (7). Dalla serie di dati ottenuti è stata poi calcolata la media dei valori, la deviazione standard ed il CV%. Il limite del bianco è stato valutato per tutte le classi di analiti oggetto di verifica secondo il protocollo CLSI-EP17/A2 (8)

Valutazione dell'accuratezza diagnostica

Per ogni analita (Tabella 1), la valutazione è stata eseguita analizzando almeno 10 campioni veri positivi e veri negativi rispettivamente ai quali era stato precedentemente assegnato un valore target con i metodi di riferimento in spettrometria di massa (Waters UPLC-TQD, Milford, CT, USA) accreditati nel nostro laboratorio secondo lo Standard Internazionale ISO 15189. Di questi campioni, almeno due per analita avevano una concentrazione compresa nell'intervallo $-/+25%$ dal valore soglia.

Tabella 1
Campioni utilizzati per la valutazione dell'accuratezza diagnostica

Classe	Veri Positivi	Veri Negativi
Cocaina	15	22
Opiacei	10	19
Cannabinoidi	12	20
Metadone	12	22
Amfetamine	20	13
Ecstasy	11	24
Buprenorfina	13	26

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche dei dati per la verifica dell'imprecisione dei metodi sono state effettuate con il software R (v 4.0.1) (A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e il software Microsoft Excel versione 2007 (Redmont, WA, USA). Tramite una funzione dedicata e progettata seguendo i riferimenti contenuti nella linea guida CLSI 15-A3 (6), il software R restituisce, attraverso l'analisi della varianza e una serie di ulteriori calcoli, la stima della ripetibilità e della precisione intra-laboratorio (S_{WL}) e la determinazione del limite di verifica superiore UVL (Upper Verification Limit). I valori di UVL sono calcolati a partire dalle prestazioni di imprecisione dichiarate dal produttore sulla base delle prestazioni del metodo in verifica. La determinazione di UVL è effettuata se la DS totale è maggiore della precisione dichiarata dal produttore (7). L'accettabilità dei risultati di sensibilità e la specificità diagnostica è stata valutata in base agli intervalli di confidenza al 95% (IC95%) calcolati secondo il metodo di Wilson a partire dai risultati dichiarati dal produttore.

RISULTATI

Imprecisione intra-laboratorio

I valori di imprecisione ottenuti per ciascun analita sono riportati nella Tabella 2. Tali valori sono stati ottenuti su campioni a concentrazioni di analita prossime a quelle utilizzate dal produttore, secondo quanto previsto dalla norma ISO 15189. S_{WL} è definita come il grado di concordanza fra i risultati di misure eseguite in sedute analitiche diverse (6). Si esprime numericamente attraverso la stima dell'imprecisione attorno alla media tramite la deviazione standard (DS), o in termini relativi tramite la stima del coefficiente di variazione percentuale (CV%).

Tabella 2

Valori medi ed imprecisione intra-laboratorio delle misure eseguite sull'analizzatore IlabTaurus

n=15	Valore Assegnato (ng/mg)	Media (ng/mg)	Deviazione Standard	CV% S_{WL}	CV% S_{PROD}	UVL
Cocaina	0,34	0,40	0,02	5,53	7,78	
Oppiacei	0,20	0,19	0,02	9,92	10,30	
Cannabinoidi	0,16	0,21	0,02	9,19	8,01	12,43
Metadone	0,38	0,41	0,04	8,88	15,41	
Amfetamine	0,41	0,45	0,04	8,19	6,91	10,04
Ecstasy	0,34	0,35	0,03	8,40	5,24	8,39
Buprenorfina	0,22	0,23	0,02	7,69	5,80	8,30

S_{WL} , imprecisione intra-laboratorio;

S_{PROD} , imprecisione intra-laboratorio dichiarata dal produttore;

UVL, Upper Verification Limit.

Limite di bianco

Su un totale di 60 campioni negativi, il limite del bianco è risultato ampiamente inferiore al limite dei valori soglia utilizzati (Tabella 3).

Accuratezza diagnostica

La sensibilità (SE_{LAB}) e specificità (SP_{LAB}) diagnostica dei metodi in valutazione sono state verificate sulla base dei risultati ottenuti sui campioni riportati nella Tabella 4 facendo riferimento a specifici valori soglia (Tabella 3). I valori di SE_{LAB} e SP_{LAB} ottenuti sono stati confrontati con la sensibilità (SE_{PROD}) e la specificità (SP_{PROD}) dichiarate dal produttore.

DISCUSSIONE

Nel laboratorio clinico l'accertamento dello stato di dipendenza dalle sostanze d'abuso fornisce un'informazione fondamentale sia dal punto di vista clinico che medico-legale, ed è per questo motivo che le procedure utilizzate devono essere affidabili. In questo ambito diagnostico, come in molti altri, infatti, è ben nota l'importanza che il dato di laboratorio riveste nella decisione clinica e quanto essa sia funzionale agli esiti del paziente (9). Per tale motivo, il laboratorio deve assicurare il corretto inquadramento clinico del paziente attraverso il raggiungimento ed il mantenimento di un elevato standard di qualità (10). La scelta della matrice da utilizzare è strettamente correlata al tipo di informazione necessaria per il corretto inquadramento del paziente. L'analisi della matrice pilifera è senza dubbio uno degli strumenti più promettenti per l'accertamento dell'uso ripetuto e continuo di xenobiotici quali ad esempio le droghe d'abuso (2).

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di verificare le prestazioni analitiche di sette metodi semi-quantitativi disponibili in commercio per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera prima della loro

Tabella 3*Limite del bianco*

n=60	Media (ng/mg)	Deviazione Standard	Limite del bianco	Valore soglia (ng/mg)
Cocaina	0,07	0,03	0,12	0,20
Oppiacei	0,00	0,01	0,02	0,20
Cannabinoidi	0,01	0,02	0,04	0,10
Metadone	0,02	0,04	0,09	0,20
Amfetamine	0,02	0,02	0,05	0,20
Ecstasy	0,00	0,00	0,00	0,20
Buprenorfina	0,005	0,002	0,008	0,01

Tabella 4*Risultati ottenuti dalla verifica della sensibilità e specificità diagnostica*

Classe	SE _{PROD}	SE _{LAB}	SP _{PROD}	SP _{LAB}
Cocaina	94,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Oppiacei	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Cannabinoidi	90,0%	100,0%	100,0%	95,2%
Metadone	89,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Amfetamine	100,0%	100,0%	100,0%	92,9%
Ecstasy	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Buprenorfina	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*SE_{PROD}, sensibilità diagnostica dichiarata dal produttore;**SE_{LAB}, sensibilità diagnostica;**SP_{PROD}, specificità diagnostica dichiarata dal produttore;**SP_{LAB}, specificità diagnostica.*

introduzione nella pratica clinica routinaria.

I risultati S_{WL} ottenuti per gli analiti cocaina (5,53%), oppiacei (9,92%), e metadone (8,88%) hanno evidenziato un'impresione intra-laboratorio inferiore a quella dichiarata dal produttore dimostrando quindi migliori prestazioni analitiche. S_{WL} per i cannabinoidi, ecstasy, buprenorfina ed amfetamine hanno mostrato invece un'impresione (CV%) maggiore di quella dichiarata dal produttore (S_{PROD}); pertanto, è stato eseguito il test UVL per il calcolo del limite superiore di verifica per l'impresione totale. I risultati dell'impresione intra-laboratorio, hanno dimostrato che i metodi per la determinazione delle amfetamine (8,19%), della buprenorfina (7,69%) e dei cannabinoidi (9,19%) sono risultati idonei poiché S_{WL} ottenuto è inferiore a UVL (10,04%, 8,30% e 12,43% rispettivamente). Mentre S_{WL} per ecstasy (8,40%), pur

risultando maggiore a UVL (8,39%), è ampiamente inferiore all'impresione accettabile in base allo stato dell'arte (<15%) (11) (Tabella 2).

Per quanto riguarda la valutazione dell'accuratezza diagnostica l'analisi dei risultati ha evidenziato valori di SP_{LAB} e SP_{PROD} sovrapponibili e pari al 100%, ad eccezione dei metodi per i cannabinoidi (95,2%) e le amfetamine (92,9%) che hanno prodotto un risultato falso positivo su un totale, rispettivamente, di 13 e 20 campioni piliferi veri negativi confermati con il metodo HPLC-MS/MS. Tuttavia, nei metodi di screening, i risultati falsi positivi non rappresentano una criticità significativa in quanto vengono successivamente sottoposti ad analisi di verifica con metodologie di secondo livello. In questo caso l'accettabilità di SP_{LAB} è stata valutata in base all'incertezza attribuibile alla SP_{PROD} , tramite gli IC95% calcolati secondo il metodo di Wilson.

L'analisi statistica, ha dimostrato che SP_{LAB} ottenuta, è per entrambi i metodi compresa nell'intervallo di confidenza calcolato (IC amfetamine: 20,65-100%; IC cannabinoidi: 20,65-100%). Gli ampi limiti di confidenza riportati, sono attribuibili alla bassa numerosità dei campioni negativi utilizzati dal produttore. I risultati di SE_{LAB} ottenuti sono sovrapponibili ai dati di SE_{PROD} eccetto per i metodi cocaina (SE_{LAB} 100%) e cannabinoidi (SE_{LAB} 100%) nei quali SE_{LAB} ottenuta è migliore rispetto a SE_{PROD} (94,0% e 90,0%), evidenziando quindi le migliori prestazioni analitiche del laboratorio (Tabella 4). Il confronto tra i risultati ottenuti con i dati di imprecisione intra-laboratorio, specificità e sensibilità dichiarati dal produttore, dimostra che il laboratorio è in grado di operare con le stesse e, in alcuni casi, migliori specifiche di prestazione analitica caratterizzate da elevata qualità e conformi a quanto previsto dalle linee-guida, in particolare quando applicati all'analisi di sostanze presenti a basse concentrazioni. Inoltre, in una valutazione generale che consideri l'efficienza globale del processo, va sottolineato che, benché la complessità del pretrattamento del campione richieda un tempo-uomo maggiore rispetto alla determinazione su matrice urinaria, la riduzione significativa del numero di campioni totali da esaminare garantisce comunque una diminuzione del numero di ore complessive del personale tecnico da impiegare in questo specifico ambito diagnostico.

Nella nostra esperienza, dal momento dell'introduzione dei metodi descritti nella pratica diagnostica routinaria, sono stati analizzati in circa 7 mesi più di 420 campioni inviati per:

- accertamenti di secondo livello sui laboratori;
- monitoraggio delle terapie farmacologiche sostitutive e controllo di eventuali ricadute da parte del Ser.D.;
- rilascio delle patenti di guida da parte delle Commissioni Medico Locali.

Tale attività, è stata svolta in 29 sedute analitiche, con 4 operatori diversi, evidenziando sempre soddisfacenti prestazioni analitiche con $CV\% < 11$ nei controlli interni di qualità e ottimi risultati di accuratezza diagnostica negli schemi di VEQ per tutti gli analiti.

In conclusione, i risultati ottenuti nel nostro studio, evidenziano la notevole importanza della valutazione e verifica dei metodi, prima della loro introduzione nella pratica routinaria, poichè consentono di produrre evidenze, con metodologie scientificamente corrette, sulle specifiche di qualità dei risultati che i professionisti di laboratorio possono garantire nei diversi ambiti diagnostici.

Va sottolineato, inoltre, che i dati riportati nello studio, riguardano una diagnostica biochimica particolarmente critica quale lo screening delle droghe d'abuso che effettuato su matrice pilifera presenta importanti ricadute non solo sulla gestione clinica e medico-legale, ma anche sull'efficienza generale delle attività di laboratorio in questo specifico ambito diagnostico. Solamente metodologie caratterizzate da adeguata accuratezza e buona precisione consentono l'adozione dei metodi di screening su matrice pilifera con concentrazioni attese

molto inferiori rispetto a quelle riscontrate nella più tradizionale matrice urinaria e con la contemporanea opportunità di applicare nelle attività routinarie del laboratorio clinico, diagnostiche biochimiche finora svolte in laboratori di riferimento o di alta specializzazione (2,12).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Pacifici R, Lopez A, Pellegrini M, et al. Il ruolo del laboratorio nella clinica delle tossicodipendenze. *Ann Ist Super Sanità* 2000;36:9-16.
2. Pichini S, Zuccaro P, Pellegrini M, et al. L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica. *Ann Ist Super Sanità* 2000;36:17-27.
3. La Torre R, Civit E, Svaizer F, et al. High throughput analysis of drugs of abuse in hair by combining purposely designed sample extraction compatible with immunometric methods used for drug testing in urine. *Forensic Sci Int* 2010;196:18-21.
4. Leonardi C, Assi C, Bandini C, et al. Studio multicentrico nazionale per la valutazione della potenza analitica di un metodo di dosaggio delle sostanze d'abuso in matrice cheratinica. *Mission* 2008;28:19-22.
5. ISO15189:2012 Medical laboratories: particular requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2012.
6. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline 3rd ed. CLSI document EP15-A3; CLSI Wayne, PA, 2014.
7. Vidali M, Padoan A, Dittadi R, et al. Protocollo operativo per la verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche. *Biochim Clin* 2019;43:228-43.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA, 2012.
9. Plebani M. Contenimento dei costi nel laboratorio clinico: razionamento o razionalizzazione? *Biochim Clin* 2016;40:123-8.
10. Colucci AP, Gagliano-Candela R. Costruzione di un Sistema di Qualità per il laboratorio chimico-tossicologico. *Biochim Clin* 2006;30:106-11.
11. https://www.iss.it/droga/-/asset_publisher/CjKTpUEurcwM/content/linee-guida-per-la-determinazione-delle-sostanze-dabuso-nella-matrice-pilifera (ultimi accesso: aprile 2021).
12. Favretto D, Pichini S, Bucchioni P, et al. Documento di consenso Gruppo di Studio di Farmacotossicologia Clinica e Doping SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI). Modalità per lo svolgimento di indagini di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso. *Biochim Clin* 2019;43:449-52.

Applicazione del Sistema Toyota alla fase pre-analitica come azione di miglioramento a seguito di un evento avverso: l'esperienza del Laboratorio Analisi dell'Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA)

Marta Matera¹, Alessia Tomei², Marco Vezzosi³, Fiamma Balboni³

¹Direzione Aziendale - Lean Manager Istituto Fiorentino Cura e Assistenza IFCA, Firenze

²Clinical Risk Manager Istituto Fiorentino Cura e Assistenza IFCA, Firenze

³Laboratorio Analisi Istituto Fiorentino Cura e Assistenza IFCA, Firenze

ABSTRACT

Pre-Analytical phase optimization through Lean Principles as a reaction to an adverse event: the experience of the laboratory service of the Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA).

Introduction: incident reporting and risk analysis are pivotal activities in the clinical laboratory to ensure patient safety. This paper describes an adverse event that occurred in February 2021 in the clinical laboratory of the Istituto Fiorentino Cura e Assistenza (IFCA) relating to a SARS-CoV-2 testing. Briefly, patients need a negative molecular test on a sample taken 2 days pre-operatively, but in one occasion a number of tests were not done on time due to a failure of the laboratory organization, and the surgery was postponed.

Methods: the subsequent analysis of the event showed that a rethinking of the entire pre analytical phase was necessary and the Toyota Production System (TPS) was used to establish a completely revised work flow.

Results: with the involvement of the entire laboratory staff and the support of a TPS specialist, the pathway was entirely redesigned: tubes colour codes were defined, dedicated working areas were implemented in order to obtain a space where the staff members can verify, at a glance, the status and the results of each step of the workflow.

Discussion: the application of the Toyota system to the pre-analytical phase of the laboratory has created a tidy and clean environment, with dedicated spaces for all the samples. The involvement of the staff in the improvement process has guaranteed the compliance of the operators to the new organisation.

Parole chiave: sistema Toyota, fase preanalitica, valutazione del rischio

INTRODUZIONE

L'analisi degli eventi avversi è l'attività che consente lo studio delle criticità e offre l'opportunità di individuare azioni di miglioramento applicabili al contesto analizzato (1).

L'attento sforzo organizzativo e formativo svolto in ambito sanitario in quest'ultimo decennio (2,3) ha portato alla consapevolezza della necessità della gestione del rischio clinico con un approccio sistematico alla sicurezza del paziente e all'uso di procedure e di check-list quali strumenti condivisi riconosciuti efficaci per la prevenzione degli eventi avversi. Rimane comunque, all'interno di questo sistema, l'aspetto legato al fattore umano che deve essere, per quanto possibile, gestito con la ricerca di soluzioni anche semplici che possano facilitare

l'attenzione anche attraverso "misure barriera" (4).

Il Toyota Production System (TPS) nasce a metà del secolo scorso in Giappone dopo la seconda guerra mondiale (5). L'allora direttore generale Taiichi Ohno capì che per riuscire a migliorare la produttività della sua azienda, la Toyota, doveva necessariamente individuare un metodo diverso da quello sviluppato negli Stati Uniti dalla Ford, perché troppo rigido e ancorato a metodi produttivi che non sarebbero durati nel tempo. Fu proprio durante un viaggio negli Stati Uniti che Taiichi Ohno, osservando l'organizzazione di un supermercato capì come far crescere e far diventare la Toyota una tra le più importanti aziende automobilistiche al mondo.

Il Metodo Toyota ha alla base il reale coinvolgimento del personale operativo nei processi di cambiamento aziendale. Solo così infatti si riesce ad ottenere il

Corrispondenza a: Fiamma Balboni, Istituto Fiorentino Cura e Assistenza IFCA, Firenze, Via del Pergolino 4/6, 50139 Firenze, E-mail lab.ifca@giomi.com

Ricevuto: 19.04.2021

Revisionato: 17.05.2021

Accettato: 04.06.2021

Pubblicato on-line: 05.08.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.049

“miglioramento rapido” (snellire i processi aziendali nel minor tempo possibile), tramite l'identificazione del valore e l'eliminazione degli sprechi. Il tutto al fine di far scorrere le attività lungo un flusso continuo, ovvero libero da sprechi (così detti Muda).

In occidente il TPS è meglio conosciuto come “Lean Production”, appunto produzione snella.

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere l'esperienza vissuta dal personale del Laboratorio dell'Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA) nell'analisi di un evento avverso con danno al paziente e della relativa gestione tramite applicazione del sistema Toyota che ha portato ad un coinvolgimento di varie figure professionali, chiamate in prima persona a dare un contributo al progetto.

Descrizione del contesto e del caso

Il laboratorio analisi IFCA non esegue esami di microbiologia che pertanto sono inviati ad un laboratorio esterno. Il laboratorio IFCA è anche centro di smistamento di tutti gli esami di anatomia patologica provenienti dai reparti interni; anch'essi sono inviati a laboratori esterni.

I campioni destinati ai laboratori esterni di microbiologia o anatomia patologica vengono depositati dal personale addetto al trasporto interno in contenitori standard posizionati sul piano di lavoro principale del laboratorio e sottoposti ad un primo processo di classificazione sulla base della tipologia di campione e della sua destinazione finale. Vengono poi raggruppati in contenitori secondari, sempre posizionati sui banconi del laboratorio, in attesa del passaggio del personale addetto al trasporto presso il laboratorio finale, trasporto che avviene a orari concordati.

Nello specifico, l'evento avverso con danno al paziente, ha riguardato i tamponi per la diagnosi molecolare del virus SARS-CoV-2 che vengono inviati al laboratorio del Presidio Ospedaliero di Prato.

Un sabato di febbraio 2021, come di routine, pervennero in laboratorio i tamponi molecolari dei pazienti ricoverati nella struttura e quelli dei pazienti afferenti al servizio di pre-ricovero. Questi ultimi riguardano tutti i pazienti che saranno sottoposti ad intervento chirurgico il lunedì successivo e con ricoveri programmati per la domenica pomeriggio o il lunedì mattina, a seconda del tipo di intervento a cui si devono sottoporre e l'ordine assegnato in sala operatoria.

I tamponi molecolari furono, come di consueto, stoccati in un contenitore su un bancone del laboratorio in attesa del passaggio del fattorino per il laboratorio di Prato, previsto per le ore 16. Purtroppo, a causa della quantità di campioni presenti in quel momento in laboratorio, furono appoggiati su un bancone secondario, su cui normalmente non viene posizionato materiale in attesa di lavorazione ma solo materiale già lavorato o contenitori usati in attesa di essere sanificati.

Per un disguido dei sistemi di trasporto il fattorino non effettuò il passaggio ad IFCA e il personale presente in

laboratorio, impegnato nella normale attività diagnostica non si rese conto della dimenticanza. Alla chiusura serale del laboratorio, il personale di turno smontante, non notò il contenitore con i tamponi molecolari rimasti in attesa che rimase pertanto a IFCA.

Il personale del turno domenicale non si accorse della presenza del materiale fino al primo pomeriggio, quando avendo notato la mancanza dei referti, fu interpellato il laboratorio di Prato che chiarì che i tamponi non erano mai giunti a destinazione. Solo a quel punto questi furono notati sul bancone secondario del laboratorio, ancora in attesa di trasporto.

Furono ovviamente inviati immediatamente al laboratorio di microbiologia, ma la normale programmazione di sala e dei ricoveri era ormai compromessa con notevole danno dei pazienti in attesa di intervento.

Dell'evento avverso è stata fatta segnalazione al Clinical Risk Manager IFCA e si è svolto un audit Gestione Rischio Clinico (GRC). Durante l'audit è stato analizzato l'evento con l'aiuto di una scheda Failure Mode and Effect Criticality Analysis (FMECA) con rilevazione dei fallimenti sia attivi e che latenti. Fra i fallimenti latenti, la logistica della sezione dedicata alla fase pre-analitica del laboratorio ha mostrato di avere sicuramente un effetto preponderante sull'evento, pertanto è stato deciso di dedicarvi particolare attenzione all'interno del piano di miglioramento. La consulenza di un esperto sul sistema Toyota ci ha fornito la soluzione.

METODI

Seguendo i principi del sistema di produzione Toyota si è proceduto prima di tutto all'analisi del percorso, e alla mappatura di tutti i punti che costituiscono il percorso; l'analisi costituisce la fotografia dello stato attuale (“as-is”). È stato quindi individuato il “flusso del valore” (cioè quell'insieme di attività, svolte dal personale di laboratorio, che creano valore per il cliente. Sono stati quindi eliminati gli sprechi ed è stata disegnata la mappa del “to-be” ovvero del percorso ottimizzato, tramite la riprogettazione del percorso degli “esami esterni” e degli spazi di lavoro. Per questi ultimi è stata applicata la metodologia Toyota 5S (6)¹, che prevede l'utilizzo di codici colore, di scaffali o punti specifici dedicati alle diverse attività quali stoccaggio, gestione materiali cartacei e simili. Pertanto seguendo questa metodologia è stato assegnato ad ogni esame la propria collocazione e il proprio colore. Con questa logica è stata anche riorganizzata la gestione del materiale cartaceo che deve anch'esso seguire il flusso corretto in coerenza temporale e spaziale con la gestione dell'esame che lo genera.

Durante il percorso Lean è stato perseguito il concetto di mettere “ogni cosa al suo posto e assegnare un posto ben preciso ad ogni cosa”, tutto ciò al fine di

¹Maggiori dettagli sulla metodologia Toyota sono riportati nel Materiale Supplementare (1S).

evitare o cercare almeno di prevedere, ogni errore che potrebbe generarsi lungo il processo, riuscendo così a creare un flusso del valore continuo e privo di intoppi. Questa riorganizzazione dovrebbe permettere di rendere un servizio migliore e di qualità al paziente, innescando un sistema di miglioramento continuo nel tempo.

RISULTATI

Dall'analisi dell'evento occorso, è scaturita la necessità di rivedere la fase pre-analitica con una particolare attenzione al fattore ergonomico e alla riorganizzazione degli spazi (7), tale da consentire un controllo visivo della fase di lavorazione dei campioni biologici destinati all'esterno per analisi non eseguite in loco, in qualche modo paragonabile all'applicazione di una check-list di processo (8). L'applicazione del sistema Toyota per la semplificazione del percorso a livello logistico ha consentito l'applicazione della "barriera" a prevenzione del possibile fallimento umano (9-10).

La mappatura del processo è rappresentata nella Figura 1: sono utilizzati dei post-it di diversa colorazione per identificare con colori diversi le diverse tipologie di attività. I post-it gialli rappresentano le attività principali del processo che vengono gestite all'interno del laboratorio analisi. Le attività descritte tramite post-it arancioni sono quelle che escono dal processo perché sono attività afferenti al laboratorio ma gestite da servizi esterni ad esso e sono quelle che hanno generato degli errori. I post-it verdi rappresentano i documenti prodotti per ogni attività e quindi il materiale cartaceo che deve essere gestito dal personale del laboratorio analisi.

Le attività sono descritte e schematizzate nella Tabella 1. Qui è stato schematizzato sia lo stato attuale dei processi, "as-is", che lo stato futuro, "to-be", evidenziando come ad ogni errore corrispondesse un'azione di miglioramento futura.

La Figura 2 rappresenta come venivano gestiti gli spazi prima dell'applicazione delle tecniche Lean. Nella Figura 3 è mostrato il risultato finale a seguito dell'applicazione del sistema 5S nel laboratorio analisi.

L'evento occorso ad IFCA ha rappresentato un errore, con grave danno ai pazienti, che ha svelato la fragilità del sistema. La presa in carico del problema e la modalità di risposta alla non conformità, tramite approccio strutturato, rappresentano i risultati primari. La Direzione ha deciso quindi di rivedere la fase pre-analitica in base alla metodologia Toyota, già in uso presso la struttura ospedaliera, attuando un piano di miglioramento come deciso in sede di Audit GRC. I piani di miglioramento prevedono il relativo monitoraggio della efficacia delle azioni intraprese a cadenze predefinite; in questo caso è stata stabilita una valutazione a 6 mesi (ottobre 2021) e a 1 anno (febbraio 2022). L'indicatore scelto è il confronto tra il numero delle non conformità prima e dopo la implementazione del metodo Toyota. La situazione rilevata è la seguente: trasporto tamponi in 6 mesi n=156; numero trasporti tamponi anomali = 1 pari allo 0,64%; standard di accettabilità = zero trasporti anomali/6 mesi, pari allo 0%.

DISCUSSIONE

Il TPS è finalizzato ad accrescere la flessibilità dell'azienda, attraverso l'organizzazione di strutture agili

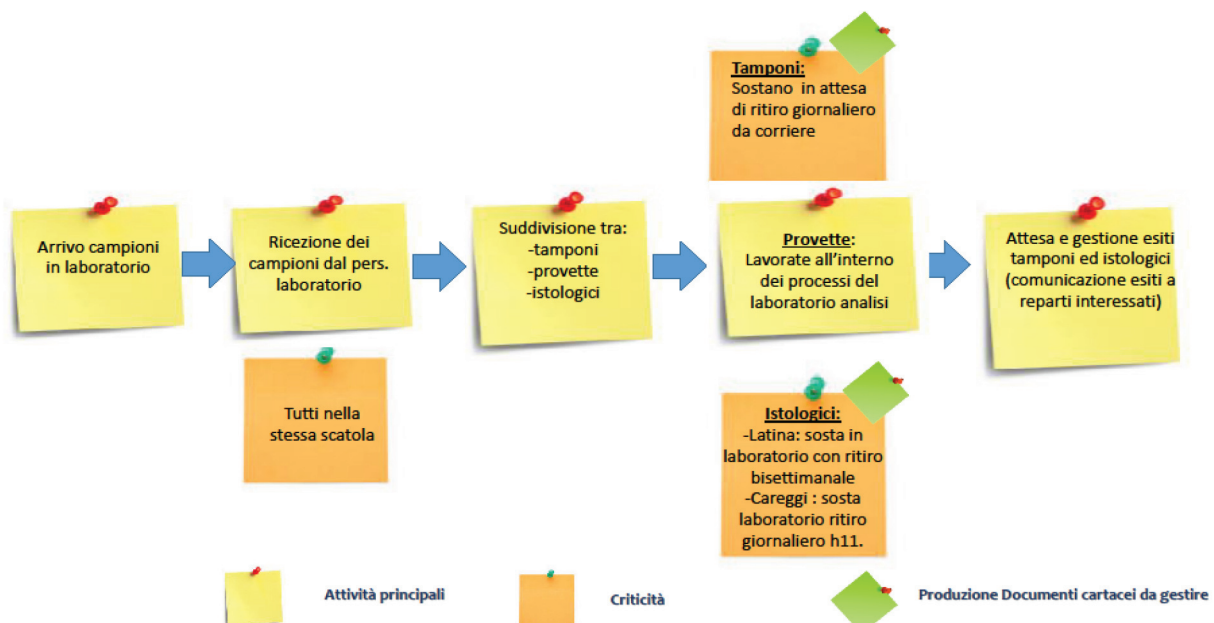


Figura 1
Gestione degli esami nel laboratorio analisi (as-is).

Tabella 1
Descrizione attività laboratorio percorso esami da esternalizzare

Criticità	Situazione attuale (AS-IS)	Anzione di miglioramento (TO-BE)
Contenitore ricezione tamponi COVID-19	Trasparente	Differenziare dalle altre
Gestione tamponi COVID-19	Sostano in spazio non adeguato	Individuazione spazio dedicato ed evidenziato
Gestione esami istologici	No spazio dedicato	Individuazione spazio dedicato
Gestione materiale cartaceo prodotto	No spazio dedicato	5S



Figura 2
Laboratorio analisi IFCA prima della applicazione del sistema 5S.



Figura 3
Laboratorio analisi IFCA dopo l'applicazione del sistema 5S.

e l'impiego "intelligente" delle persone. Il suo scopo infatti non è quello di far lavorare le persone più velocemente ma di far fluire il lavoro tramite l'individuazione ed eliminazione di tutto ciò che costituisce uno spreco o un errore (5,8,9).

L'ambito di applicazione di tali principi non può essere pensato solo ed esclusivamente per le aziende manifatturiere ma, al contrario, essendo un metodo molto versatile basato sul cambiamento rapido e il continuo miglioramento, può essere applicato in diversi ambiti, tra cui la sanità (8,9).

Il metodo Lean deve essere pensato come un abito sartoriale da poter cucire appositamente sulla base delle esigenze della struttura e dell'ambito di applicazione in cui si decide di utilizzarlo.

Per le strutture sanitarie ancor più che per le aziende manifatturiere avvicinarsi quanto più possibile al concetto di "zero difetti" è di fondamentale importanza e l'approccio Lean è sicuramente un valido strumento per raggiungere questo obiettivo.

Alla base del Metodo Toyota vi sono tre pilastri fondamentali. Questi rappresentano concetti apparentemente molto semplici ma devono essere attuati sulla base di un metodo scientifico che ha come obiettivo quello di produrre risultati misurabili e tangibili.

Qualunque attività umana che abbia come finalità la creazione di qualcosa di utile deve tener conto del concetto di:

- valore;
- spreco;
- flusso.

Nel sistema Toyota è necessario, per prima cosa individuare le azioni realmente utili per fornire al cliente finale il prodotto desiderato; tutte le altre azioni devono ritenersi superflue e quindi da eliminare (Muda). A maggior ragione, in sanità il valore deve essere definito secondo il punto di vista del paziente.

Lo spreco nel Lean management è individuato in qualsiasi attività umana che assorbe risorse e non crea valore (11). All'interno di una organizzazione, spesso i Muda non vengono nemmeno percepiti, perciò la prima cosa che insegna la teoria snella è imparare a vedere. Gli sprechi esistono in ogni attività lavorativa e ad ogni livello dell'organizzazione e per riuscire ad individuarli non è sufficiente fare analisi a tavolino ma è fondamentale verificare sul campo. Il Metodo Toyota classifica i Muda in sette tipologie: la sovrapproduzione, il tempo, il trasporto, le perdite di processo, le scorte, i movimenti e i prodotti difettosi (errori nella produzione). Gli sprechi devono essere individuati ed eliminati nel minor tempo possibile e per far questo è fondamentale coinvolgere le persone che lavorano nei processi dato che conoscono in maniera approfondita il processo stesso.

Le attività creatrici di valore devono fluire senza incontrare intoppi. Obiettivo di un'azienda deve essere quello di aumentare la velocità del flusso rendendolo continuo, così facendo emergeranno gli sprechi che, una volta evidenziati, potranno essere eliminati (caccia allo spreco).

Le attività svolte nelle aziende sanitarie si realizzano

secondo un flusso spesso invisibile alle persone e ai responsabili; di conseguenza anche gli sprechi e gli errori che si verificano lungo il flusso, talvolta sono invisibili e quindi non migliorabili.

Strumento fondamentale utilizzato nel metodo Toyota per coniugare i tre pilastri sopra menzionati e per mettere in evidenza tutte le attività a valore presenti nel processo in analisi è la "mappa del flusso del valore" (VSM). Quest'ultima fornisce una visione grafica d'insieme che permette di svolgere un'analisi dettagliata di come viene creato il valore, mettendo in risalto le attività non a valore e che quindi devono essere eliminate dal processo stesso.

L'obiettivo della VSM è infatti evidenziare l'esistenza di un flusso e vederlo nella sua globalità, individuare dove si situa lo spreco o errore e chiarire le sue cause, visualizzare gli effetti delle azioni correttive pensate per migliorare in maniera rapida il flusso. Il VSM serve inoltre per costituire la base di un piano d'azione evitando scelte casuali.

Le mappe sono due; la prima che va disegnata è quella del flusso del valore attuale. Questa rappresenta il processo nel momento in cui viene analizzato ("as is"), descrivendo sia le attività a valore che quelle non a valore. Deve essere costruita insieme agli attori principali del processo stesso e può essere disegnata su un foglio oppure illustrata con dei post-it; non è necessario utilizzare strumenti complessi ma, al contrario, le tecniche Lean si basano sul principio del "veloce e grezzo, non lento ed elegante".

La seconda è la mappa del flusso del valore futuro ("to be") nella quale si definiscono le azioni da realizzare nel breve termine per eliminare le azioni non a valore emerse durante la mappatura dello stato attuale.

Il "to be" non è altro che la rappresentazione grafica del flusso del valore dopo le modifiche migliorative fatte alla mappa del flusso del valore attuale, al fine di eliminare tutti gli sprechi e far scorrere il flusso senza intoppi.

È utile sottolineare sempre che nessuno strumento Lean funzionerebbe se non ci fosse il coinvolgimento delle persone che lavorano nei processi; l'analisi non può essere fatta esclusivamente dai dirigenti ma deve necessariamente coinvolgere le persone ai vari livelli organizzativi aziendali. Anche le azioni migliorative devono essere suggerite da chi è in prima linea perché chi vi lavora conosce il processo meglio di chiunque altro e probabilmente ha già le risposte ai problemi che si creano quotidianamente.

Oltre alla mappa del flusso del valore esistono anche altri strumenti per analizzare le attività ed evidenziare gli errori come ad esempio: la spaghetti chart, il diagramma di Ishikawa, l'analisi della causa radice e ancora strumenti come il visual management, la settimana Kaizen, le 5S (vedi materiale supplementare 1S). Questi strumenti hanno differenti utilizzi a seconda dei processi in analisi ma presentano caratteristiche comuni: sono di facile utilizzo e comprensione, permettono di raggiungere risultati migliorativi nel breve periodo, permettono di misurare gli stessi risultati nel tempo e proprio per questi motivi possono essere impiegati da personale di ogni

livello organizzativo.

Per quanto riguarda il sistema 5S, da noi utilizzato in questo percorso, è un sistema finalizzato a “mettere in ordine” il posto di lavoro, ed è il punto di partenza per qualsiasi organizzazione che voglia implementare correttamente le tecniche Lean. È infatti impossibile pensare di introdurre il metodo Toyota senza applicare preventivamente il 5S.

Spesso lo strumento fondamentale utilizzato è il “visual management” o gestione a vista che consente a chiunque di controllare, in qualsiasi momento, lo stato del sistema di erogazione del servizio, individuare nell'immediato eventuali anomalie ed essere in grado di gestirle tempestivamente. Per quanto riguarda il nostro percorso di miglioramento, riteniamo che l'attuazione delle tecniche Lean abbia portato ad un incremento della qualità del servizio erogato al paziente e ai reparti da parte del laboratorio analisi e ad una diminuzione del rischio di errore come già riportato in altri studi (13). L'introduzione di nuovi strumenti quali mensole e contenitori colorati dedicati agli esami che devono essere inviati all'esterno e, mensole dedicate al materiale cartaceo che staziona per lungo tempo in laboratorio, cassette dedicate ai referti che dovranno essere consegnati ai diversi reparti interni alla struttura, ha contribuito a creare un flusso del valore continuo delle attività svolte dagli operatori. L'utilizzo di questi semplici strumenti ha fatto sì che il personale direttamente coinvolto nel processo avesse degli standard visivi e immediati di riferimento in grado di far scattare dei campanelli di allarme nel momento in cui il flusso non dovesse scorrere nella maniera corretta, permettendo così di intervenire immediatamente ed eliminare l'errore.

La sorveglianza nel tempo dell'efficacia dell'azione di miglioramento intrapresa sarà oggetto di verifiche periodiche così come stabilito nel piano di miglioramento dell'audit GRC.

CONCLUSIONI

Il metodo Toyota è stato introdotto presso IFCA nel 2010 come strumento per riorganizzare diversi processi aziendali; in quell'anno è stata inserita tra le figure di direzione aziendale quella del Lean Manager che si occupa di monitorare i processi, individuare eventuali criticità e analizzarle secondo i principi del metodo Toyota. Tramite gli strumenti del Lean Management è stato infatti riorganizzato il comparto operatorio, il reparto di chirurgia e diversi uffici amministrativi come l'ufficio prenotazioni, ricoveri, oltre che il magazzino e, a seguito dell'evento avverso qui descritto, parte dei processi afferenti al laboratorio analisi (14,15).

L'implementazione del metodo Toyota in laboratorio ha permesso l'ottimizzazione dei percorsi di lavoro creando un ambiente ordinato, strutturato e visivamente di impatto. L'utilizzo di codici colore e di postazioni dedicate ha permesso di ordinare il flusso dei campioni da inviare all'esterno e del relativo cartaceo in modo agile ed efficace. Questa organizzazione permette ad ogni operatore, in qualsiasi momento, di capire con una

semplice occhiata a che punto è il flusso del lavoro, rivelando in un attimo se ci sono intoppi o ritardi. Tutti gli operatori del laboratorio si sono sentiti coinvolti nell'analisi e pianificazione del percorso e con soddisfazione hanno visto la costruzione degli spazi dedicati e hanno accolto con positività il maggiore ordine che si è venuto a creare. La semplicità di utilizzo unita all'efficacia dell'innovazione introdotta ha permesso l'adesione immediata e partecipe non solo degli operatori di laboratorio, ma anche del personale dedicato al trasporto interno ed esterno.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Singh H, Graber ML. Improving diagnosis in health care: the next imperative for patient safety. *N Engl J Med* 2015;373:2493-5.
2. Vincent C, Amalberti R. Safety in healthcare is a moving target. *BMJ Qual Saf* 2015;24:539-40.
3. Lippi G, Plebani M. The importance of incident reporting in laboratory diagnostics. *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69:811-3.
4. Vincent C, Amalberti R. *Safer Healthcare Strategies for the Real World*. Berlin: Springer 2016.
5. Womak JP, Jones DT, Roos D. *The Machine that changed the world*, Simon e Schoser LTD, 2007.
6. Bianchi F. *Visual management. Le 5S per gestire a vista*, Milano: Guerini e Associati 2010.
7. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:720-7.
8. Bellandi T, Albolino S, Tartaglia R, et al. *Human factors and ergonomics in patient safety management*. London: Taylor & Francis, 2012.
9. Galgano A, Galgano C. *Il sistema Toyota per la sanità. Più qualità meno sprechi*, Milano: Guerini e Associati, 2006.
10. Ohno T. *Lo spirito Toyota*, Torino: Piccola biblioteca Einaudi, 2004.
11. Womak P, Jones DT. *Lean Thinking come creare valore e bandire gli sprechi*, Milano: Guerini Next, 2008.
12. Galgano A. *Toyota. Perché l'industria Italiana non progredisce*, Milano: Guerini e Associati, 2005.
13. Letelier P, Guzmán N, Medina G, et al. Workflow optimization in a clinical laboratory using lean management principles in the pre-analytical phase. *J Med Biochem* 2021;40:26-32.
14. Matera M. *Il Lean Management nella Casa di Cura Ulivella e Glicini di Firenze*. In: *Lean healthcare management*. Milano: IPSOA, 2017.
15. Matera M. *Il Lean Management presso la Casa di Cura Ulivella e Glicini*. In: *Lean thinking nelle aziende di servizi*. Milano: IPSOA, 2015.

Errori di identificazione del paziente: un progetto SIBioC orientato alla gestione di un problema persistente

Ada Aita¹, Andrea Padoan¹, Roberto Guerranti², Marcello Fiorini³, Claudia Bellini², Francesca Tosato¹, Michela Peloso¹, Elisa Piva¹, Rachele Pajola⁴, Maria Lorubbio⁵, Benedetta Cremonesi⁶, Antonella Bassi⁷, Roberta Rolla⁸, Giovanni Introcaso⁹, Mario Plebani¹, Sabrina Buoro¹⁰ e Fiamma Balboni¹¹

¹Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS)-Servizi di Diagnostica Integrata, Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Ospedale-Università di Padova

²Unità Operativa Complessa Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

³Unità Operativa Complessa Laboratorio Analisi Chimico Cliniche VDE e AVC, Presidio Ospedaliero Felice Liotti, Pontedera, Pisa

⁴Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedali Riuniti Padova Sud Schiavonia, AULSS6 Euganea Veneto

⁵Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche, Ospedale di San Donato, Arezzo

⁶Servizio di Medicina di Laboratorio-ASST Bergamo Ovest, Treviglio, BG

⁷Laboratorio di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona

⁸Laboratorio di Chimica Clinica, Dipartimento della Salute, Ospedale Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale, Novara

⁹Unità di Medicina di Laboratorio, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano

¹⁰Centro di Riferimento Regionale per la Qualità dei Servizi di Medicina di Laboratorio c/o ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

¹¹Medicina di Laboratorio, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA), Firenze

Questo contributo è stato presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 ottobre 2020, Virtual Edition, quale Comunicazione Orale

ABSTRACT

Wrong blood in tube: a SIBioC project for a persistent problem.

Introduction: recently, multi-analytes delta-check (MDC) has been proposed as a more effective tool in identification errors (IE) prevention. In this context, "Haematology" and "Clinical Risk" SIBioC working groups launched a project aiming to develop a cell blood count (CBC) MDC. This work is aimed to describe the project and some preliminary results.

Methods: the project consists of four phases: collection of CBC results from 15 Italian laboratories to create an original dataset (OD); pilot study on a smaller dataset (SD) i.e., creation of an artificial mix-up dataset-MD containing IE by casual resampling of the SD and identification of the best statistical model to create a MDC; identification of the most accurate MDC on OD; testing the MDC in involved labs and verification of its effectiveness.

Results: the SD included 2,367 pair of consecutive results for the same patient (patients' age: 0-100 years; the majority of repetitions were within days). The SD casual resampling generated a MD with 2,000 pair of patient-mixed consecutive results. When one of the most frequent used delta-check alert ($\Delta\text{MCV}=7\text{fL}$) was applied to detect IE in MD, the method accuracy was low ($\text{AUC}=0.542$). On the contrary, testing of a multivariate model, obtained by a stepwise logistic analysis, allowed to obtain a more accurate MDC in IE detection ($\text{AUC}=0.931$, sensitivity=91.6%, specificity=94%).

Conclusions: MDC may offer a practical strategy to identify IE prior to test reporting, improving patient safety. However a good planning of project workflow, selection of methodology, tools and staff competence are key elements to reach the objectives.

Parole chiave: errori di identificazione, delta-check, fase preanalitica

Corrispondenza a: Ada Aita, Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS)-Servizi di Diagnostica Integrata, UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale-Università di Padova, via Giustiniani 2, 35128, Padova, Tel 04982801, E-mail ada.aita@aopd.veneto.it

Ricevuto: 22.04.2021

Revisionato: 25.05.2021

Accettato: 04.06.2021

Pubblicato on-line: 02.08.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.048

INTRODUZIONE

Nell'intero processo di cura del paziente, la pratica del prelievo di fluidi biologici, in particolare quelli ematici, è molto frequente e avviene in contesti molto diversi per organizzazione e volumi di lavoro. Il prelievo può, infatti, essere eseguito in regime di ricovero di breve o lunga durata, d'urgenza, ambulatoriale, distrettuale o domiciliare.

Sebbene questa pratica clinica appaia semplice da eseguire e scevra da complicanze, la mancata osservanza delle linee guida e delle procedure operative, nonché l'esecuzione del prelievo in contesti di emergenza-urgenza o in ambienti affollati e caotici, può generare molti errori (come ad esempio errore di identificazione, provetta errata, campione non idoneo) (1). L'errore di identificazione del paziente e dei campioni è stato riconosciuto come forse il più pericoloso tra gli errori preanalitici. La corretta identificazione del paziente è di fatto fondamentale per assicurare risultati accurati e costituisce un obiettivo primario di ogni organizzazione sanitaria (2,3).

Nelle ultime decadi sono stati introdotti numerosi strumenti per impedire che l'errore di identificazione del paziente si verifichi (linee-guida per l'identificazione del paziente, braccialetti identificativi, check-list e strumenti automatizzati per assistere l'operatore in tutte le fasi del prelievo) o che esso sia intercettato prima di generare conseguenze (delta check, validazione tecnica e clinica dei risultati), anche gravi, per il paziente (4-10).

Tuttavia nonostante gli sforzi compiuti, l'errore di identificazione del paziente non è ancora stato abbattuto e il tasso d'errore riportato in letteratura (0,04-1%) sembra comunque sottostimato (11). Si stima che il 9% degli errori si verifichi in regime d'urgenza, con un'incidenza correlata a personale non di laboratorio e che l'86% degli errori sia intercettato in fase di validazione del risultato. Nel 72% dei casi riportati in letteratura, l'errore ha determinato la ripetizione del prelievo e l'allungamento dei tempi di risposta ma nessuna variazione del trattamento o dell'esito per il paziente. Tuttavia nel 4% dei casi è riportata una variazione del trattamento e nel 22,6% dei casi un impatto clinico sfavorevole (11).

Alla luce di quanto riportato, la fase di identificazione del paziente richiede ancora molta attenzione e deve essere presidiata. In questo contesto, il laboratorio clinico deve introdurre tutti gli strumenti utili ad intercettare l'errore e prevenire conseguenze per la sicurezza del paziente. Tra gli strumenti da sempre utilizzati in laboratorio ricordiamo il delta check, ovvero il confronto del risultato di un paziente con uno ottenuto precedentemente, per verificare, sulla base di regole prestabilite, se ci si trovi in presenza di una differenza plausibile.

Sebbene il delta check sia stato ampiamente utilizzato per intercettare l'errore di identificazione, sono disponibili pochi studi che ne valutino l'efficacia. Recentemente Schifman et al. (12), hanno condotto uno studio prospettico volto ad indagare le pratiche per

definire i delta check (analiti, intervalli di tempo e metodologia di calcolo, intervallo di misura, tasso di variazione per generare l'allarme) e valutare l'efficacia dello strumento a fronte delle azioni intraprese in seguito alla generazione dell'allarme. Allo studio hanno partecipato 49 laboratori, e i risultati ottenuti hanno dimostrato chiaramente quanto poco armonizzati siano i criteri per la definizione dei delta-check in termini di metodologia, analiti e unità di misura impiegate. Relativamente all'efficacia invece è stato dimostrato che le regole di allarme che considerano i parametri dell'esame emocromocitometrico (in particolare MCV ed emoglobina) hanno permesso di intercettare la maggior parte degli errori di identificazione del paziente (10,12) e che i delta check che tenevano conto di più analiti e/o parametri, avevano una sensibilità maggiore nella rilevazione dell'errore. Tuttavia solo il 30% dei partecipanti aveva introdotto delta-check su due o più analiti e nessuno utilizzava metodi multivariati probabilmente a causa delle limitate capacità dei sistemi informatizzati di laboratorio (LIS). A questo proposito l'implementazione di delta-check multi-analita rappresenta la promessa per una più efficace rilevazione degli errori di identificazione (12).

Alla luce di queste considerazioni, i due Gruppi di Studio (GdS) "Diagnostica Ematologica Integrata" e "Rischio clinico e sicurezza del paziente" di SIBioC hanno lanciato un progetto che mira a sviluppare un delta check multi-parametrico, utilizzando i parametri dell'esame emocromocitometrico, per identificare il maggior numero possibile di errori di identificazione. Scopo di questo lavoro è descrivere il progetto e riportarne i risultati preliminari.

METODI

Descrizione del progetto

Il progetto è stato organizzato in 4 fasi:

Fase 1: raccolta dati, volta a creare un database originale contenente un numero sufficiente di esami emocromocitometrici consecutivi per ciascun paziente. Il database è stato popolato da una casistica variegata, grazie al contributo di laboratori diversi per bacino d'utenza, strumentazione impiegata e organizzazione.

Fase 2: studio pilota per identificare il modello statistico più efficace per la definizione di un delta-check multiparametrico. In dettaglio, la fase due prevedeva la creazione di due database: uno contenente i risultati reali di un unico laboratorio e l'altro che chiameremo "artificiale" (mis-matched dataset), ottenuto dal primo, per mescolamento casuale dei dati al fine di generare errori di identificazione attribuendo i risultati dell'emocromo di un paziente ad un altro paziente.

Fase 3: identificazione del delta-check multiparametrico più accurato e verifica dell'algoritmo individuato rispetto a delta-check comunemente utilizzati.

Fase 4: valutazione dell'efficacia e dell'applicabilità dell'algoritmo sul database originale.

Il progetto è stato lanciato nel giugno 2019 e sei laboratori, differenti per volumi di lavoro, organizzazione e localizzazione geografica hanno aderito allo studio su base volontaria.

A ciascun partecipante è stato chiesto di inviare un file excel contenente i risultati di esami emocromocitometrici di almeno 3 mesi precedenti, opportunamente anonimizzati, ma con codice univoco del paziente al fine di poter individuare i pazienti che avessero almeno due esami consecutivi. I dati ottenuti sono stati utilizzati per creare il dataset originale.

Le fasi del progetto sono raffigurate nella Figura 1. In verde sono rappresentate le fasi già concluse.

Creazione dei dataset di training e testing

I dati dell'esame emocromocitometrico di un solo laboratorio (Lab 1), senza distinzione di tipologia del paziente (pazienti interni ed esterni), sono stati considerati nelle successive valutazioni. In questo dataset erano presenti i seguenti parametri espressi in valore assoluto e, quando applicabile, in percentuale: leucociti (WBC), eritrociti (RBC), emoglobina (HBG), ematocrito (HCT), valore corpuscolare medio (MCV), contenuto emoglobinico corpuscolare medio (MCH), concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC), piastrine (PLT), ampiezza della distribuzione dei globuli rossi (RDW), ampiezza della distribuzione delle piastrine (PDW), volume piastrinico medio (MPV), volume medio delle piastrine (P-LCR), ematocrito piastrinico (PCT), neutrofilii (NEUT), linfociti (LYMPH), monociti (MONO), eosinofili (EO), basofili (BASO), numero degli eritroblasti circolanti (NRBC), reticolociti (RET), basso rapporto di fluorescenza (LFR), medio

rapporto di fluorescenza (MFR), alto rapporto di fluorescenza (HFR), frazione reticolocitaria immatura (IRF), cellule progenitrici emopoietiche (HPC). Inizialmente sono stati individuati tutti i soggetti che avevano risultati ripetuti (4 367 soggetti). Questi soggetti sono stati utilizzati per costruire due datasets. Il primo dataset, che conteneva i risultati mis-matched è stato generato come segue:

- una serie di 2 000 soggetti sono stati estratti in modo casuale da Lab1;
- il replicato dell'emocromo completo di ciascun soggetto è stato generato artificialmente abbinando l'emocromo completo di un altro soggetto per generare il mis-matched dataset.

Il secondo dataset è stato ottenuto considerando i 2 367 soggetti rimanenti in Lab 1. Successivamente, i due datasets sono stati uniti completando la realizzazione di un dataset che complessivamente includeva risultati mis-matched e risultati ripetuti dello stesso paziente. Per ciascun parametro ematologico, è stata calcolata la differenza tra i replicati. A questo punto, è stato generato tramite una selezione casuale un training dataset di 3 242 soggetti (74,3% del totale), e un testing dataset di 1 125 soggetti (25,7% del totale). Il training dataset è stato utilizzato per la generazione del modello multivariato, il testing dataset per la verifica delle performances ottenibili.

Analisi statistica

Il metodo grafico del diagramma a scatola e baffi è stato utilizzato per riportare i risultati dei parametri studiati. La media e la deviazione standard sono state utilizzate come statistica descrittiva. L'analisi logistica è

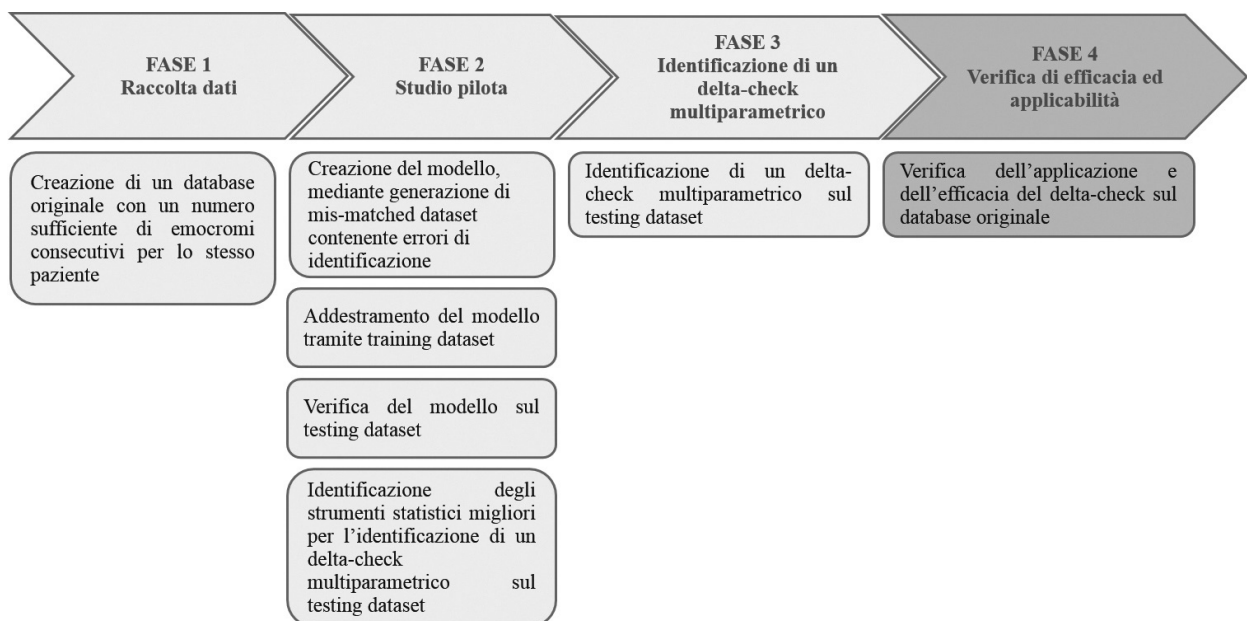


Figura 1

Rappresentazione grafica delle fasi del progetto.

stata utilizzata per studiare quali parametri ematologici (trasformati applicando il logaritmo in base 10) potessero essere correlati alla presenza di un mis-match. L'analisi ROC non parametrica è stata utilizzata, assieme al test di Youden, per calcolare il miglior valore soglia. Per l'analisi multivariata è stato usato il modello logistico stepwise, che permetteva l'inclusione automatica delle variabili laddove raggiungessero una significatività statistica almeno di $p < 0,1$. L'accuratezza calcolata rappresenta il numero di veri positivi e veri negativi sul numero totale di individui. Tutte le analisi statistiche sono state ottenute utilizzando il software libero R v3.4.

RISULTATI

Il dataset con i risultati ripetuti dei pazienti (secondo dataset) comprendeva un numero di prelievi consecutivi pari a 1143 femmine e 1224 maschi, di età compresa tra 0 e 100 anni [media (DS): 61,94 (23,83)]. La maggior parte dei prelievi consecutivi era stata eseguita entro 5 giorni dal primo prelievo.

Il rimescolamento casuale dei risultati ha portato alla costruzione di un mis-matched dataset contenente 2 000 coppie di risultati consecutivi. È stata valutata la dispersione dei valori per singolo parametro e per espressione (valore assoluto e percentuale) del singolo parametro nei due dataset. I dati, riportati nella Figura 2, mostrano dispersioni variabili sulla base dell'espressione e del parametro considerato, e comunque la dispersione risulta maggiore nel mis-matched dataset a causa del rimescolamento casuale introdotto per lo scopo del lavoro.

È stata verificata l'efficacia di utilizzo di modelli univariati nel distinguere i campioni correttamente identificati da quelli non correttamente identificati, applicando uno dei delta-check maggiormente impiegati nei laboratori, ovvero una variazione del MCV superiore a ± 7 fL. L'accuratezza del metodo, la sensibilità, la specificità e il valore predittivo positivo e negativo sono riportati in Tabella 1.

Al fine di migliorare l'accuratezza del metodo, dall'analisi ROC mediante calcolo dell'indice di Youden,

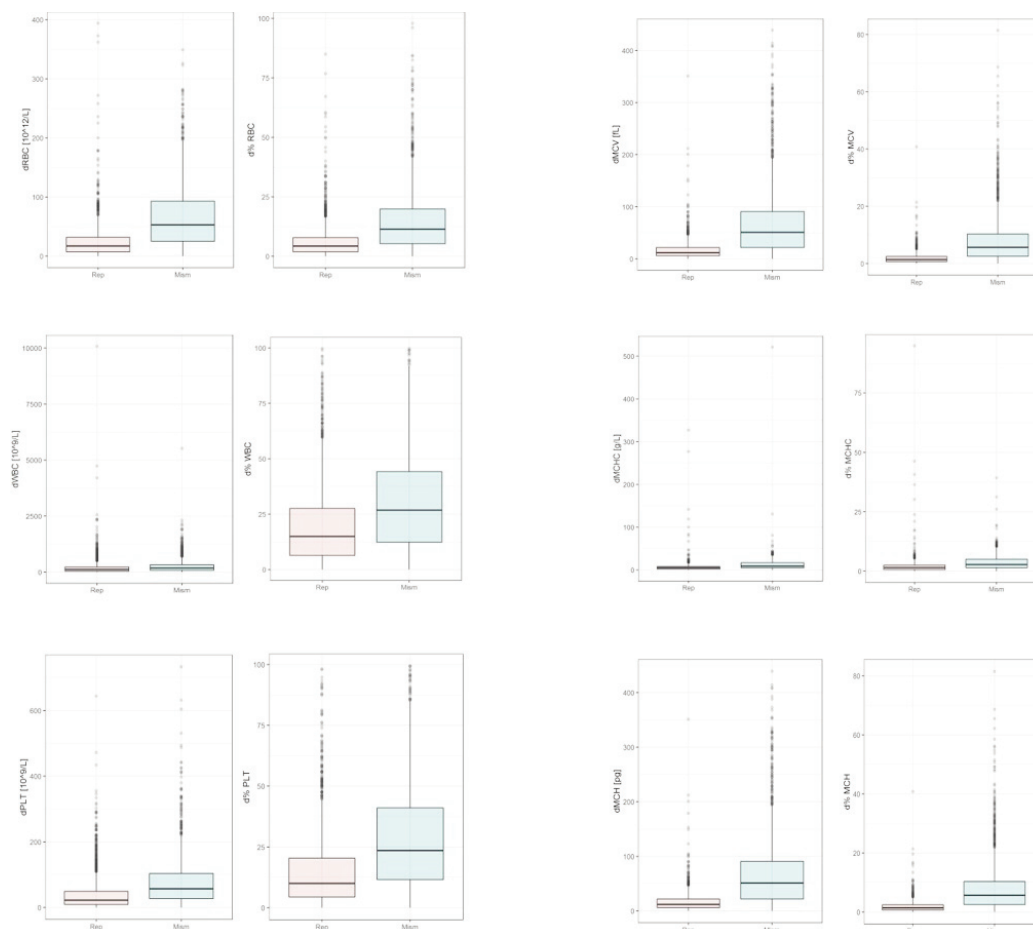


Figura 2

Dispersione dei dati per singolo parametro e per espressione (valore assoluto e percentuale) nel primo (Mism) e secondo (Rep) dataset, di alcuni dei parametri dell'esame emocromocitometrico, presi ad esempio.

dRBC, variazione del conteggio dei globuli rossi; dWBC, variazione del conteggio leucocitario; dPLT, variazione del conteggio piastrinico; dMCV, variazione del volume corpuscolare medio; dMCHC, variazione della concentrazione corpuscolare media dell'emoglobina; dMCH, contenuto cellulare medio di emoglobina).

Tabella 1

Accuratezza, sensibilità, specificità, VPP, VPN di modelli univariati e multivariati nell'identificazione di campioni non correttamente identificati

	Modello univariato		Modello multivariato	
	Δ MCV >7 fL	Δ MCV >28,5 fL	Δ MCV >28,5 fL ed età	Analisi stepwise di tutti i parametri
Accuratezza (IC)	54,15% (52,8-55,5)	81,4% (79,0%-83,6%)	80,5% (78,04-82,76)	93,11% (91,32-94,63)
Sensibilità (IC)	92,4% (91,2%-93,5%)	70,3% (65,4%-74,8%)	73,2% (68,4%-77,5%)	91,6% (88,2%-94,3%)
Specificità (IC)	33,1% (31,5%-34,6%)	87,1% (84,4%-89,4%)	84,2% (81,4%-86,8%)	94,0% (91,8%-95,8%)
VPP (IC)	43,2% (41,7%-44,7%)	73,5% (68,7%-78,0%)	70,4% (65,6%-74,8%)	90,1% (86,5%-93,0%)
VPN (IC)	88,7% (87,0%-90,4%)	85,1% (82,4%-87,6%)	86,0% (83,2%-88,4%)	95,0% (92,9%-96,6%)

Δ MCV, delta del volume globulare medio; IC, intervalli di confidenza; VPP, valore predittivo positivo; VPN, valore predittivo negativo.

è stato individuato il miglior valore soglia per la rilevazione degli errori di identificazione, che risultava essere pari ad una variazione del MCV >28,5 fL, ottenendo una sensibilità del 87,1% e una specificità del 70,3% (Tabella 1). È stato successivamente valutato se l'accuratezza migliorava utilizzando un modello multivariato che oltre al miglior valore soglia identificato (Δ MCV >28,5 fL) teneva in considerazione anche la variabile età dei pazienti (Tabella 1). Successivamente, è stata condotta un'analisi multivariata utilizzando come predittori tutti i parametri dell'esame emocromocitometrico, refertati e non refertati. Utilizzando il testing dataset per verificare le prestazioni diagnostiche, questo modello si è rivelato molto accurato (AUC=0,931, sensibilità=91,6%, specificità=94%) (Tabella 1). Le variazioni dei seguenti parametri: MHC, RBC, HCT, EO, RDW, MONO, BASO, P-LCR, LYMPH, PCT, età sono risultate significative nell'identificazione di un mis-match.

DISCUSSIONE

L'errore di identificazione del paziente risulta essere tra i meno frequenti se confrontato alle altre tipologie d'errore descritte nel "Total Testing Process" (1). Tuttavia, se valutato in termini di rischio clinico, l'errore di identificazione diventa l'errore a più alto rischio per la sicurezza del paziente, a causa del potenziale alto grado di gravità del danno per il paziente stesso (13).

Sebbene l'obiettivo finale a garanzia della salute e sicurezza del paziente sia arrivare a "zero errori", e tale obiettivo sia particolarmente auspicabile quando ci si riferisce agli errori di identificazione, gli strumenti di gestione del rischio finora implementati non ci hanno ancora permesso di raggiungerlo (14). Ulteriori sforzi devono essere quindi messi in campo dai professionisti di laboratorio, tenendo conto anche degli sviluppi tecnologici e metodologici. Recentemente lo sviluppo di delta-check multiparametrici si è dimostrato essere un valido approccio alla rilevazione tempestiva dell'errore di identificazione (15). L'esame emocromocitometrico, oltre

ad essere uno degli esami maggiormente richiesti nella pratica clinica, si contraddistingue per l'elevata individualità, la ridotta variabilità biologica intra-individuale e la ridotta differenza critica dei singoli parametri in soggetti esenti da patologia. Tra i parametri refertati, l'MCV e l'MCHC mostrano la variabilità biologica più bassa, sono stabili per 24 ore e in situazioni cliniche come l'emorragia non cambiano significativamente perché la risposta dei reticolociti non inizia prima di 2-3 giorni. L'MCHC, essendo un parametro calcolato, ha inoltre il beneficio di evidenziare malfunzionamenti strumentali (16).

Queste caratteristiche hanno reso l'esame emocromocitometrico ideale per lo sviluppo di allarmi di controllo della variazione o delta-check. Alla luce della letteratura recente in merito alle potenzialità di delta-check multiparametrici di intercettare gli errori di identificazione del paziente (15), i due Gruppi di Studio (GdS) "Diagnostica Ematologica Integrata" e "Rischio clinico e sicurezza del paziente" di SIBioC hanno deciso di lanciare un progetto volto a sviluppare un delta check multi-parametrico, a partire dai parametri dell'esame emocromocitometrico, che permettesse di individuare il numero più elevato possibile di errori di identificazione paziente.

In questo studio emerge chiaramente come delta-check multiparametrici ottenuti mediante strumenti di apprendimento automatico (o machine-learning) siano più accurati dei delta-check univariati nell'intercettare gli errori di identificazione del paziente.

Il delta-check comunemente applicato alla sola variazione dell'MCV (Δ MCV >7 fL) si è rivelato poco accurato poiché, sebbene molto sensibile (92%), è risultato poco specifico (33%). Pertanto nell'ambito dell'intero processo di laboratorio, la continua interruzione dei flussi di lavoro per la verifica di allarmi generati dall'implementazione di un delta-check con un valore predittivo positivo così basso (0,4322), oltre a costituire un dispendio di tempo ed energie, potrebbe generare disattenzioni ed errori da parte del personale

deputato alla refertazione. Allarmi continui inoltre potrebbero essere ignorati dal personale soprattutto in casi di flusso di lavoro intenso. Questo approccio infine non è ottimale se lo scambio di campioni coinvolge pazienti con MCV simile e senza particolari caratteristiche ematologiche (17).

I risultati del progetto hanno dimostrato come l'accuratezza del delta-check univariato migliori nel caso in cui si valuti una variazione più ampia dell'MCV ($\Delta\text{MCV} > 28,5$ fL), tuttavia nella pratica reale è poco probabile che ci si trovi di fronte a variazioni così ampie. Tale variabilità è giustificata dal metodo impiegato e più in dettaglio dalla volontà di costruire un database che includesse pazienti diversi per età, sesso, reparto di provenienza e tipologia e che il mis-match venisse generato in maniera assolutamente casuale, allo scopo di individuare degli allarmi che potessero essere implementati indipendentemente dalla tipologia di laboratorio, dagli utenti afferenti e dalla localizzazione geografica.

Al contrario, il delta-check multiparametrico si è dimostrato molto più accurato e quindi utile allo scopo del lavoro e nella pratica quotidiana in accordo ai dati riportati in letteratura (15). Il modello multivariato individuato mediante analisi stepwise ha consentito di intercettare gli errori di identificazione con una sensibilità e una specificità del 92% e 94% rispettivamente e un valore predittivo positivo e negativo elevati. Il delta-check multiparametrico individuato include solo i parametri la cui variazione è risultata significativa all'analisi stepwise. Parametri quali l'MCV e l'MCHC, anche se normalmente utilizzati per intercettare gli errori, non mostravano variazioni significative, pertanto risultano esclusi dall'algoritmo individuato. È necessario sottolineare che la valutazione della dispersione dei valori per singolo parametro e per espressione (valore assoluto o percentuale) valutata nei due database (testing e mis-matched) non mette in luce solo come i parametri che non mostravano variazioni significative nei due database non sono utili alla definizione di nuovi allarmi, ma anche come l'espressione del parametro sia un aspetto fondamentale per la definizione dell'allarme. Inoltre, è da considerare che l'approccio statistico utilizzato in questo studio, che lascia al software la scelta automatica delle variabili da includere, può avere prestazioni inferiori a quelle ottenibili con altri algoritmi. Un altro aspetto metodologico di rilievo è che il metodo utilizzato attribuisce un peso simile ai diversi parametri, mentre nessun sistema di riduzione della dimensionalità dei dati è stato applicato a priori. Infine, metodi statistici superiori potrebbero evitare più facilmente insidiose problematiche, quali la collinearità. Tuttavia, l'approccio dell'analisi logistica è stato preferito perché presenta il grosso vantaggio di poter ottenere un'equazione matematica, facilmente implementabile in sistemi informatici anche se privi di supporto statistico (quali middleware strumentali) e ciò rappresenta uno scopo importante di questo lavoro.

In generale, è comunque importante considerare che gli approcci statistici multivariati presentano molte limitazioni, tra cui (nel caso del delta check) il rischio di identificare dei predittori di scambio paziente non clinicamente rilevanti: è pertanto scopo del professionista valutare con l'esperienza se i modelli identificati possano avere una reale valenza nella medicina di laboratorio. L'eventuale limitazione all'approccio statistico, d'altro canto, può diminuire la significatività del risultato, come per esempio si sarebbe ottenuto nel nostro caso dall'esclusione del modello dei parametri posizionali. È molto interessante notare infatti come, tra i parametri del modello multiparametrico del delta-check individuato erano invece inclusi, per le caratteristiche della metodologia impiegata, parametri posizionali meglio noti come "cell population data". Questi ultimi, di recente interesse nella definizione di alcuni quadri clinici come la sepsi (18), potrebbero assumere un ruolo rilevante nell'ambito delle regole di allarme delta-check, considerata la ridotta variabilità biologica riportata in letteratura (19). Tuttavia è necessario ricordare che le prestazioni dei parametri posizionali sono strettamente legate alla strumentazione utilizzata, pertanto l'algoritmo individuato potrebbe subire variazioni se applicato al database originale contenente dati ottenuti da emocitometri diversi. Sebbene i dati analizzati in questo studio si riferiscano ad un solo laboratorio e quindi l'algoritmo identificato non possa essere applicato a tutti i laboratori, i risultati finora ottenuti ci permettono di concludere che l'implementazione di delta-check multiparametrici consente di intercettare un numero maggiore di errori di identificazione del paziente e che i "cell population data" sembrano essere promettenti in questo ambito.

L'obiettivo ultimo di questo progetto è quello di individuare un delta-check multiparametrico che possa essere applicato a tutti i laboratori; tuttavia potrebbe essere necessario verificare se delta-check multiparametrici individuati per gruppi di laboratori che condividono la stessa strumentazione o lo stesso bacino d'utenza, oppure ancora per tipologia di paziente (ad esempio il reparto di provenienza) possano rivelarsi più efficaci nella rilevazione dell'errore di identificazione. Sicuramente una buona pianificazione delle fasi dello studio, la selezione della metodologia, degli strumenti e le competenze del personale sono elementi chiave per raggiungere gli obiettivi prefissati e volgere alla conclusione del progetto. Tuttavia ulteriori aspetti saranno da valutare in questo ambito, in merito alla responsabilità di revisione dell'algoritmo implementato e alla reale possibilità di implementare l'algoritmo individuato sui middleware ad oggi disponibili. Tutte queste considerazioni supportano il fatto che sebbene si tratti di un argomento da sempre trattato, l'errore di identificazione del paziente resta un problema persistente nell'ambito della sicurezza delle cure.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Sciacovelli L, Lippi G, Sumarac Z, et al. Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety" of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Pre-analytical quality indicators in laboratory medicine: Performance of laboratories participating in the IFCC working group "Laboratory Errors and Patient Safety" project. *Clin Chim Acta* 2019;497:35-40.
2. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, et al. Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) and Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI). Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:2015-38.
3. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, et al. Raccomandazione congiunta EFLM-COLABIOCLI per il prelievo di sangue venoso. Traduzione Italiana. *Biochim Clin* 2019;43:204-27.
4. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Accuracy in Patient and Sample Identification; approved guideline, 2nd ed. CLSI document GP33. CLSI Wayne, PA, 2019.
5. Dhatt GS, Damir HA, Matarelli S, et al. Patient safety: patient identification wristband errors. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:927-9.
6. Giavarina D, Lippi G. Blood venous sample collection: Recommendations overview and a checklist to improve quality. *Clin Biochem* 2017;50:568-73.
7. Aita A, Marin R, Pozzato C, et al. La check-list in Medicina di Laboratorio quale strumento di assicurazione della qualità e della sicurezza del paziente: l'esempio del prelievo venoso. *Biochim Clin* 2018;42:131-40.
8. Piva E, Tosato F, Plebani M. Pre-analytical phase: The automated ProTube device supports quality assurance in the phlebotomy process. *Clin Chim Acta* 2015;451:287-91.
9. Randell EW, Yenice S. Delta Checks in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2019;56:75-97.
10. Randell EW, Yenice S, Khine Wamono AA, et al. Autoverification of test results in the core clinical laboratory. *Clin Biochem* 2019;73:11-25.
11. Lippi G, Chiozza L, Mattiuzzi C, et al. Patient and sample identification. Out of the maze? *J Med Biochem* 2017;36:107-12.
12. Schifman RB, Talbert M, Souers RJ. Delta Check practices and outcomes: a q-probes study involving 49 health care facilities and 6541 delta check alerts. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:813-23.
13. Badrick T, Gay S, Mackay M, et al. The key incident monitoring and management system - history and role in quality improvement. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:264-72.
14. Aita A, Sciacovelli L, Plebani M. Laboratory-related errors: you cannot manage what you don't measure. You manage what you know and measure. *Diagnosis (Berl)* 2017;4:193-95.
15. Rosenbaum MW, Baron JM. Using machine learning-based multianalyte delta checks to detect wrong blood in tube errors. *Am J Clin Pathol* 2018;150:555-66.
16. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Use of delta-check in the Medical Laboratory; approved guideline, 1st ed. CLSI document EP33. CLSI Wayne, PA, 2016.
17. Berardi M, Balboni F, Buoro S. Rischio clinico ed ematologia di laboratorio: è possibile affidarsi al solo volume corpuscolare medio per scoprire l'errata identificazione del paziente. *Biochim Clin* 2021;45:e4-e6.
18. Piva E, Zuin J, Peloso M, et al. Monocyte distribution width (MDW) parameter as a sepsis indicator in intensive care units. *Clin Chem Lab Med* 2021 doi: 10.1515/cclm-2021-0192.
19. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. *Clin Chim Acta* 2017;473:147-56.

Studio sulla presenza di componenti monoclonali in pazienti con infezione da SARS-CoV-2: dati preliminari

Roberta Marinelli¹, Andrea Sartorio², Valentina Muraro¹, Flora Formenton¹, Francesca Pennetta¹, Elena Simoni³, Gian Luca Casoni⁴, Alberto Mazza⁵, Stefano Cuppini⁵, Alessandro Camerotto¹

¹UOC Medicina di Laboratorio, AULSS 5 Polesana, Rovigo

²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona

³Dipartimento Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova

⁴UOC Pneumologia, AULSS 5 Polesana, Rovigo

⁵UOC Medicina, AULSS 5 Polesana, Rovigo

ABSTRACT

Presence of monoclonal components in SARS-CoV-2 patients: preliminary data.

Introduction: electrophoresis of serum proteins (EF) is indicated for the identification and monitoring of monoclonal components (CM). It has been shown that interleukins play a role in the differentiation of B cells in plasma cells producing immunoglobulins; it has been also demonstrated that COVID-19 patients show a higher prevalence of CM in comparison to the general population. The aim of this work is to retrospectively evaluate the presence of CM in patients hospitalized with COVID-19, compared to a population of patients admitted in non-COVID-19 wards.

Methods: EF was performed in the two groups of patients (COVID positive and negative) using capillary electrophoresis. Patients with previous plasma cell dyscrasias have been excluded.

Results: the results show that in the COVID positive group, the incidence of CM is statistically higher compared to the COVID negative group (39.7% versus 13.3%). In one patient, the CM was no longer detectable when the swab became negative.

Conclusions: the study confirmed that the viral infection produces detectable CM, probably transitory as shown by a case index. The pathogenesis of the phenomenon could be explained by the cytokine stimulus on B cells and by the interaction of the virus with the lymphocyte ACE 2 receptor. Larger studies are needed to confirm the presented data.

Parole chiave: elettroforesi delle sieroproteine, componente monoclonale, COVID-19

INTRODUZIONE

Una componente monoclonale (CM) è una immunoglobulina secreta da un clone di linfociti B che, se prodotta in quantità sufficiente, viene evidenziata come un picco monoclonale all'elettroforesi delle proteine sieriche (EF) (1). Come indicato da anni, anche nelle pagine di questa rivista dal Gruppo di Studio "Proteine" SIBioC, l'indicazione per la richiesta di EF è la ricerca delle CM, la loro quantificazione densitometrica e il successivo monitoraggio indicato con MRI (Minimum Re-testing Interval) da 3 a 6 mesi dopo il primo riscontro e, se stabili, ogni 6-12 mesi (2-3).

Nel marzo 2021, nella recrudescenza dei ricoveri per

COVID-19, si è avuta la percezione che l'incidenza di CM nei reparti dedicati ai pazienti COVID-19 della AULSS 5 Polesana (Rovigo) fosse elevata; il fenomeno è stato quindi analizzato più approfonditamente.

Lo scopo del lavoro è valutare la presenza di CM in pazienti COVID-19 positivi rispetto ad una popolazione di pazienti COVID-19 negativi ricoverati nello stesso periodo.

METODI

È stato condotto uno studio retrospettivo considerando due gruppi di pazienti: un gruppo COVID-19 negativo (COV-) e un altro COVID-19 positivo (COV+).

Corrispondenza a: Roberta Marinelli, UOC Medicina di Laboratorio, AULSS 5 Polesana, Rovigo, E-mail roberta.marinelli@aulss5.veneto.it

Ricevuto: 17.06.2021

Revisionato: 27.08.2021

Accettato: 30.08.2021

Pubblicato on-line: 14.09.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.062

Nel periodo compreso tra il 25 marzo e il 30 aprile 2021, sono stati considerati i pazienti ricoverati nelle Unità Operative rispettivamente di Medicina Generale dell'Ospedale di Rovigo (pazienti COV-) e di COVID (Terapia Semi Intensiva e Pneumologia) dell'Ospedale di Trecenta (pazienti COV+).

Nella Unità Operativa di Medicina Generale i pazienti erano ricoverati soprattutto per patologie croniche cardiovascolari, epatopatie, nefropatie e patologie respiratorie. La richiesta di elettroforesi proteica (EF) è inserita nel profilo di ingresso di questi reparti quale "consuetudine prescrittiva"; i pazienti considerati avevano perciò tutti eseguito una EF al momento del ricovero ospedaliero e quindi prima di ogni somministrazione farmacologica. In particolare, per i pazienti COV+ trattati con l'anticorpo monoclonale Tocilizumab (n 5), l'EF è stata eseguita prima della somministrazione del farmaco.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con precedente riscontro di presenza di CM o diagnosi nota per discrasie plasmacellulari, mediante ricerca nel data base del laboratorio, quando possibile. I pazienti oggetto dello studio, così selezionati, sono stati 163.

I sieri sono stati analizzati mediante EF con tecnologia capillare e successiva immunosottrazione per la tipizzazione della eventuale CM presente, seguendo i protocolli operativi della Ditta produttrice (Sebia, Italia). La strumentazione utilizzata è stata Capillarys 3 Tera, e Hydragel Sebia Italia per EF e immunotipizzazione, rispettivamente.

Metodi statistici

L'analisi statistica è stata eseguita con software Jamovi ver. 1.8.2, The jamovi project (2021).

La numerosità campionaria non è stata definita a priori, ma sono stati arruolati i pazienti presenti nei reparti precedentemente indicati che rispondessero ai criteri di selezione utilizzati.

Per confrontare le caratteristiche dei due gruppi, relativamente alle variabili qualitative, i dati sono stati analizzati con il test del chi-quadro o, quando necessario, con il test esatto di Fisher. Le variabili quantitative sono state analizzate con il test U di Mann-Whitney, previa esecuzione del test di Shapiro-Wilks. In seguito è stata eseguita una regressione logistica multivariata per analizzare se la presenza di CM fosse correlata o meno all'infezione. Il modello di regressione ha considerato come variabili età, sesso e presenza di COVID-19, mentre la variabile dipendente considerata è stata la presenza di CM. I risultati sono stati espressi con Odds ratio e Intervallo di Confidenza al 95% (IC 95%).

Data l'assenza di analisi a priori sulla numerosità campionaria e la differente numerosità dei due campioni, è stata eseguita un'analisi *post-hoc* per valutare la potenza statistica ottenuta. Considerando la differente prevalenza di CM nei due gruppi con una probabilità di errore $\alpha=0,05$ in un modello a due code, la potenza ottenuta è stata pari a 0,96.

Il livello di significatività scelto per tutti i test è stato $p < 0,05$.

I grafici sono stati creati con Google Fogli, Google LLC.

RISULTATI

Dei 163 pazienti arruolati, 58 costituivano il gruppo COV+ e 105 il gruppo COV-. Come presentato in Tabella 1, le caratteristiche anagrafiche dei due gruppi (sesso ed età) sono differenti anche se la significativa statistica non viene raggiunta; nel gruppo COV+ la percentuale dei maschi è maggiore (72,4 *versus* 50,5) e l'età mediana lievemente più bassa (70 *versus* 76 anni). Relativamente alla presenza di CM la differenza è, al contrario, marcata e statisticamente significativa: i pazienti con CM nel gruppo COV+ sono il 39,7%, mentre sono il 13,3% nel gruppo COV- ($p < 0,001$).

Sono stati poi valutati i pazienti rispetto alla presenza/assenza di CM sulla base di sesso, età e positività per COVID-19, riscontrando differenze statisticamente significative soltanto rispetto a quest'ultima; infatti il 62,2% dei pazienti con CM era COV+, e solo il 27,8% di questi non presentava una CM come mostrato in Tabella 2 e Tabella 3.

I risultati della tipizzazione delle CM rilevano che gli isotipi delle CM presenti nei pazienti COV- sono IgG kappa per il 42,9%, mentre nei pazienti COV+ la maggior parte delle CM (61,5%) è costituita da IgG lambda, difformemente da quanto descritto recentemente in letteratura (4), dove invece si è rilevata una prevalenza di IgG-kappa.

L'analisi di regressione logistica multivariata condotta su tutti i pazienti, i cui risultati sono riportati in Tabella 4, evidenzia che la positività per COVID-19 è associata allo sviluppo di CM indipendentemente dall'età e dal sesso, con un Odds-ratio=4,56 (IC95%: 2,03-10,29).

Tabella 1

Caratteristiche dei pazienti dei due gruppi (COVID-19 positivi e negativi) considerati nello studio. Per le variabili qualitative viene riportata la numerosità (n) e la presenza nel relativo gruppo (%); per l'età viene riportata la mediana e lo scarto interquartile (IQR)

	Pazienti COVID-19 positivi (n=58)	Pazienti COVID-19 negativi (n=105)	p
Maschi n (%)	42 (72,4%)	53 (50,5%)	0,007
Femmine n (%)	16 (27,6%)	52 (49,5%)	0,007
Età mediana (IQR)	70 (15,8)	76 (15)	0,007
CM n (%)	23 (39,7%)	14 (13,3%)	<0,001

CM, componente monoclonale.

Tabella 2

Caratteristiche dei pazienti considerati nello studio, suddivisi sulla base della presenza di CM. Per le variabili qualitative viene riportata la numerosità (n) e la prevalenza nel relativo gruppo (%); per l'età viene riportata la mediana e lo scarto interquartile (IQR)

	Pazienti con CM (n=37)	Pazienti senza CM (n=126)	p
Maschi n (%)	25 (67,6%)	70 (55,6%)	0,193
Femmine n (%)	12 (32,4%)	56 (44,4%)	
Età mediana (IQR)	71 (9)	74 (20,8)	0,582
Pazienti COVID-19 positivi n (%)	23 (62,2%)	35 (27,8%)	<0,001

CM, componente monoclonale.

Tabella 3

Caratteristiche dei pazienti considerati nello studio, divisi sulla base della presenza/assenza di componente monoclonale

	Pazienti con CM	Pazienti senza CM	Totale
Pazienti COVID-19 positivi	23	35	58
Pazienti COVID-19 negativi	14	91	105
Totale	37	126	163

CM, componente monoclonale.

Tabella 4

Regressione logistica multivariata applicata a tutti i pazienti, con variabile dipendente la presenza di componente monoclonale

	Odds-ratio	p
Sesso	0,74 IC95%: 0,32-1,7	0,457
Età	1,02 (IC95%: 0,99-1,05)	0,207
Positività per COVID-19	4,56 (IC95%: 2,03-10,29)	<0,001

IC95%, intervallo di confidenza al 95%.

DISCUSSIONE

La presenza di CM definisce le discrasie plasmacellulari (1,5), un gruppo eterogeneo di condizioni di cui fanno parte le Gammopatie Monoclonali di Significato Indeterminato (MGUS) comprese le CM transitorie, il Mieloma Multiplo Smoldering (SMM), Mieloma Multiplo (MM) e la Macroglobulinemia di Waldenstrom (WM).

Nella pandemia da SARS-CoV-2 evidenze emergenti (6,7) suggeriscono che la severità e la prognosi sfavorevole sono correlate ad una risposta del sistema immunitario fuori controllo, principalmente caratterizzata da un eccessivo rilascio di citochine, evento definito come "tempesta citochinica" (6,7). Riguardo al ruolo nella differenziazione di linfociti B in plasmacellule e produzione delle CM, è stato evidenziato (8) come le interleuchine, in particolare la IL-6, possano rappresentarne lo stimolo. Inoltre è noto che anche i linfociti B possiedono recettori ACE 2 (9) e quindi l'interazione tra il Receptor Binding Domain (RBD) della proteina spike virale e il recettore cellulare potrebbe, indipendentemente dall'interleuchina, indurre la stimolazione clonale.

Nel nostro studio la presenza di CM nel gruppo di pazienti COV+ è risultata statisticamente superiore rispetto al gruppo di controllo (COV-). Con l'analisi multivariata, inoltre, è risultato evidente come la presenza della infezione sia associata al riscontro di CM, con un Odds-ratio=4,56 (IC95%: 2,03-10,29). Questo dato sembra rafforzare l'evidenza, presente anche in altri studi (9,4), di un'associazione tra l'infezione da SARS-CoV-2 e CM. Risulta interessante notare anche che la presenza di CM nel nostro gruppo di controllo è più alta rispetto a quanto riportato in letteratura (10). Tuttavia, differenti popolazioni presentano prevalenze di CM anche molto diverse tra loro e non abbiamo dati di riferimento per la popolazione della provincia di Rovigo.

La prevalenza di maschi nel gruppo COV+ è maggiore rispetto a quella osservata nei pazienti negativi, dato coerente con la letteratura disponibile che evidenzia come i maschi siano più colpiti da forme gravi di COVID-19 e quindi più spesso necessitino di ricovero (11).

Lo studio ha rilevato anche che l'infezione induce la comparsa di "piccole" CM, (circa 2 g/L, dati non mostrati). In un caso la CM non era più rilevabile al momento della negativizzazione del tampone. Questi riscontri, considerando lo stimolo antigenico dovuto alla infezione virale, possono orientare per una classificazione di queste CM tra le discrasie plasmacellulari transitorie (12) ma, come molti altri aspetti di questa pandemia, solo il tempo (e il monitoraggio dei pazienti) potrà avvalorare o meno questa ipotesi. I dati qui presentati dovrebbero incoraggiare il monitoraggio dei pazienti con CM al fine di valutarne l'effettiva transitorietà.

A differenza di segnalazioni in letteratura che riportano CM biclonali (11), il nostro studio riporta solo monoclonali. Degno di attenzione è il trattamento dei

pazienti COV+ con Tocilizumab, anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato della classe IgG1 diretto contro i recettori dell'IL-6, solubile (sIL-6R) e legato alla membrana (mIL-6R) bloccandone la trasduzione del segnale, che potrebbe essere rilevato alla tipizzazione immunologica con la possibilità di essere confuso con le CM endogene. Nei pazienti da noi considerati, il Tocilizumab è stato utilizzato dopo l'esecuzione dell'EF e pertanto possiamo escludere che le CM rilevate abbiano un nesso di causalità con il farmaco; tuttavia il trattamento con l'anticorpo monoclonale dovrebbe essere segnalato qualora si esegua una EF in questi pazienti.

Tra i limiti dello studio vanno segnalati:

- l'arco temporale ristretto nel quale sono stati arruolati i pazienti; lo studio è derivato da un'occasionale osservazione nella fase di recrudescenza dell'infezione da SARS-CoV-2 nella primavera del 2021 con riapertura del reparto di terapia semi-intensiva COVID;
- alcuni dati non congruenti con la letteratura esistente (ad esempio il riscontro prevalente di IgG lambda), potrebbero essere attribuibili alla scarsa numerosità dei soggetti arruolati (diretta conseguenza dell'arco temporale ristretto);
- non è stato possibile verificare con certezza che tutti i pazienti con CM non avessero una CM pregressa al momento del ricovero, per carenza di informazioni sui data base disponibili.

Le decisioni degli operatori sanitari, specialmente nelle prime fasi della pandemia sono state spesso difficili e basate su evidenze scarse e poco robuste. L'auspicio è che questo studio, supportato eventualmente da altri simili su casistica più numerosa, possa essere di ausilio per la diagnostica e il monitoraggio dei pazienti e le relative complicanze, nonché per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici che sottendono l'infezione da SARS-CoV-2, in particolare per quanto riguarda i meccanismi di stimolazione del sistema immunitario da parte delle citochine e del recettore linfocitario ACE2.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Calдини A, Graziani MS, Basile U, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
2. Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
3. Vernocchi A, Dolci A, per il Gruppo di Studio SIBioC - "Proteine". Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:199-207.
4. Vashistha P, Gupta AK, Arya M, et al. Biclinal gammopathy in a case of severe COVID-19. *Clin Chim Acta* 2020;511:342-5.
5. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, et al. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2008;22:1651-7.
6. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395:1033-4.
7. Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, et al. Confronting the controversy: interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. *Eur Respir J* 2020;56:2003006.
8. Vazzana N, Ognibene S, Dipaola F. «Acute» monoclonal gammopathy in severe COVID-19. *Hematol Transfus Cell Ther* 2020;42:218-20.
9. Farina A, Labriola R, Ialongo C, et al. Transient plasma cell dyscrasia in COVID-19 patients linked to IL-6 triggering. *Microbes Infect* 2021;23:104808.
10. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-9.
11. Corradini E, Ventura P, Ageno W, et al. Clinical factors associated with death in 3044 COVID-19 patients managed in internal medicine wards in Italy: results from the SIMI-COVID-19 study of the Italian Society of Internal Medicine (SIMI). *Intern Emerg Med*. 2021;16:1005-15.
12. Camerotto A, Giacco G, De Toffoli A. Monitoraggio delle componenti monoclonali transitorie con il sistema informatico del laboratorio. *Med Lab* 1996;4:49-52.

Emoglobina glicata (HbA1c): confronto tra gli analizzatori Premier Hb9210 e ADAMStm A1c HA-8180V

Gianni Parigi^{1,2}, Anna Laura Toni^{1,2}, Carlo Scapellato¹, Mariangela Longini²

¹UOC Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italia

²Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia

ABSTRACT

Glycated hemoglobin (HbA1c): Comparison between Premier Hb9210 and ADAMStm A1c HA-8180V analyzers.

Introduction: in this study we evaluated the analytical performance of the Trinity Biotech HbPremier Hb9210 (Bray, Ireland/Kansas city, US), a boronate affinity chromatography-based high performance liquid chromatography (HPLC) system for the measurement of glycated hemoglobin. The ADAMSTM A1c HA-8180V (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japan) analyzer was used for the comparison.

Methods: three pool of blood (L1, L2, L3) and two control materials (B1, B2) were used to evaluate analytical precision of the HbPremier Hb9210, analyzing five replicates of each sample per day for five days. For the comparison, blood specimens were analyzed according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines. Both the available reference systems (IFCC, NGSP) were used.

Results: the total CVs of for low, medium and high values of the three pools (L1, L2, L3) were 0.68%, 1.72%, 1.31% respectively; and were 1.57%, 1.38% for low, and medium values (B1, B2) of the two controls when the values were expressed in mmol/mol (SI units) and 0.39%, 1.18%, 1.08% (L1, L2, L3), 0.95%, 1.07% (B1, B2) when the values were reported in % (NGSP units). Passing-Bablok regression used for the comparison of methods showed a small proportional error (slope 1.05, 95%CI: 1.02-1.07) using the IFCC reference system (mmol/mol); the error was not present with the NGSP (%). The bias found was -1.87 mmol/mol (95%CI: -4.33- 0.58) and -0.17% (95%CI: -0.39-0.05). **Discussion:** the analytical performances of HbPremier Hb9210 have been successfully verified. The instrument performs well and provides results in good agreement with those obtained with the ADAMS analyzer.

Parole chiave: emoglobina glicata, HPLC, cromatografia di affinità

INTRODUZIONE

Il diabete mellito colpisce circa l'8% della popolazione adulta nel mondo, con una prevalenza superiore al 50% in alcuni gruppi etnici, rappresentando quindi la più comune sindrome dismetabolica (1).

La determinazione dell'emoglobina glicata (HbA1c) nel sangue, è oggi ritenuto un importante marcatore biochimico utilizzato per la diagnosi, il controllo glicemico a medio/lungo termine e per valutare il rischio di sviluppare complicanze legate alla patologia (1-4), in quanto riflette una concentrazione media di glucosio nel sangue negli ultimi 2-3 mesi con una bassa variabilità a breve termine (5). Ha inoltre l'aspetto positivo di non dipendere dalla compliance del soggetto, non

richiedendo particolari preparazioni e restrizioni come il digiuno. Va inoltre considerato che l'automazione dell'esame ha permesso la riduzione del costo ed il suo utilizzo nella routine di laboratorio oltre al fatto che gli sforzi fatti per la standardizzazione e armonizzazione della determinazione negli ultimi decenni hanno permesso di ottenere delle misure di elevata qualità. Questo è stato possibile attraverso la collaborazione tra l'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) e il National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) ed ai due grandi studi clinici denominati Diabetes Control and Complications Trial, 1993 (DCCT) e UK Prospective Diabetes Study, 1998 (UKPDS) (3,6,7). Nel 2009 il comitato di esperti internazionali

Corrispondenza a: Gianni Parigi, Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo, UOC Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Viale Bracci 16, 53100 Siena, E-mail gianni.parigi@dbm.unisi.it

Ricevuto: 13.07.2021

Revisionato: 03.09.2021

Accettato: 07.09.2021

Pubblicato on-line: 07.10.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.063

composto da membri della American Diabetes Association (ADA), dell'International Diabetes Federation (IDF) e della European Association for the Study of Diabetes (EASD) raccomanda la misura della HbA1c anche per la diagnosi di diabete (8).

La rilevanza dell'utilizzo dell'HbA1c nella gestione del diabete è ben riconosciuta oltre che dai clinici anche dall'industria del diagnostico ed un centinaio di metodi commerciali sono stati sviluppati a questo riguardo rispondendo agli standard richiesti dalla procedura di riferimento (RMP) dell'IFCC e del NGSP (1,8,9).

Per quanto riguarda i metodi separativi, oggetto di questo studio, in commercio ne sono reperibili più di 30 e possono essere genericamente suddivisi in due differenti categorie in base alla tecnologia utilizzata: differenza di carica (HPLC a scambio ionico ed elettroforesi capillare) e differenza strutturale tra la forma glicata e non glicata dell'emoglobina (cromatografia di affinità al boronato e immunoassay) (10-14).

I metodi basati sulla cromatografia a scambio ionico possono risentire della presenza di varianti emoglobiniche (15,16) se la variante emoglobinica e il suo adotto glucidico non si separano perfettamente; l'impossibilità di integrare i due picchi renderà l'errore di stima consistente. Se i due picchi, di variante ed addotto glucidico, eluiscono separatamente l'errore sulla determinazione dell'emoglobina glicata risulta comunque trascurabile (come, ad esempio, in presenza delle varianti HbC e HbS).

Per quanto riguarda i metodi di cromatografia di affinità, basati sull'uso dell'acido amminofenilboronico, che reagisce specificamente con il glucosio legato all'emoglobina, non sono state riscontrate variazioni nella stima della HbA1c in presenza della maggior parte delle varianti emoglobiniche (15,17-19). Il metodo sembrerebbe invece fornire risultati sottostimati in presenza di un'elevata concentrazione di emoglobina fetale (HbF) (19). L'NGSP, a riguardo, non include la valutazione delle interferenze come parte del programma di certificazione (20).

Alla luce di quanto sino ad ora esposto, tenendo conto del numero crescente di soggetti portatori di varianti emoglobiniche dovuti ai flussi migratori e alla globalizzazione "sanitaria", il dato migliore in termini di sensibilità e specificità nell'individuazione e nel monitoraggio di soggetti diabetici sembra essere fornito dalle tecniche in HPLC.

Il confronto tra metodi analitici costituisce parte integrante e fondamentale dell'attività di valutazione dei laboratori ed è esplicitamente richiesta come requisito essenziale nei laboratori clinici e di prova dagli standard di accreditamento ISO 15189 e ISO 22870 (21-23).

Oggetto di questo lavoro è il confronto di una metodica HPLC a scambio ionico, utilizzato come metodo di riferimento, con una metodica HPLC ad affinità al boronato (recentemente disponibile in commercio) come metodo in valutazione.

METODI

Nello studio sono state comparate due cromatografie liquide ad alta prestazione (HPLC) basate su due diversi principi. Il primo è il sistema ADAMSTM A1c HA-8180V (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japan) che utilizza il principio della cromatografia a scambio cationico in fase inversa; il secondo è il sistema Trinity Biotech Premier HbPremier Hb9210 (Bray, Ireland/Kansas City, US) che utilizza il principio della cromatografia di affinità al boronato.

Per valutare, confrontare e verificare la riproducibilità totale della metodica nello strumento di prova con quanto dichiarato dalla ditta produttrice, sono state utilizzate due matrici differenti. La prima è costituita da pool di campioni di sangue intero umano provenienti dalla routine di laboratorio prelevati in K_3EDTA , con concentrazioni di HbA1c vicine a quelle utilizzate dalla ditta produttrice dello strumento in fase di validazione e riportate nella scheda tecnica (L1, L2, L3) (Tabella 1). La seconda è costituita da materiale di controllo della ditta BIORAD: LiquechekTM Diabetes Control Levels 1, 2 (B1, B2) con concentrazioni nominali di B1= 36,61 mmol/mol (5,5%) con range di accettabilità compreso tra 31,15-42,08 mmol/mol (5,0-6,0%), B2= 80,33 mmol/mol (9,5%) con range di accettabilità compreso tra 81,42-90,16 mmol/mol (8,6-10,4%). Questi campioni sono stati analizzati seguendo il protocollo 5 (replicati) x 5 (giorni), ovvero misurati per 5 volte all'interno dello stesso giorno utilizzando aliquote indipendenti degli stessi (conservate a +4 °C) per 5 giorni consecutivi senza periodi di interruzione. La riproducibilità totale ottenuta, espressa come DS entro il laboratorio, è stata confrontata con quella dichiarata dalla ditta produttrice attraverso il valore di verifica V (Tabella 1) ricavato con l'utilizzo della distribuzione del chi-quadrato come indicato dal protocollo proposto da SIBioC (21).

Per il confronto tra i due metodi sono stati utilizzati 250 campioni di sangue intero prelevati in K_3EDTA , analizzati secondo le linee guida CLSI EP09 (24) in cui si raccomanda di ripetere le sedute di analisi in giorni differenti con una tempistica ravvicinata di non più di due ore tra le esecuzioni con i due metodi. Sono state eseguite sedute giornaliere da circa 20-30 campioni in un periodo temporale di comparazione di 1 mese circa.

Prima di ogni seduta di lavoro è sempre stata verificata la qualità analitica delle strumentazioni e dei kit attraverso l'uso di carte di controllo e controlli forniti dalla ditta produttrice degli strumenti (Glyco HB Control A.Menarini Diagnostics, Hemoglobin A1c controls Trinity Biotech A.Menarini Diagnostics). Da precisare che, mentre il metodo di riferimento prevede una calibrazione a cambio colonna, il metodo in prova ha bisogno di una calibrazione giornaliera effettuata su due punti. Tutte le misurazioni sono state eseguite utilizzando una sola colonna per strumento.

Per eseguire l'analisi statistica sono stati usati iMedCalc[®] Statistical Software version 19.6.3 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) e Microsoft Excel e tutte le prove sono state effettuate nel laboratorio di Patologia

Tabella 1

Riproducibilità totale del metodo in prova (Premier Hb 9210) ottenuta ai tre livelli di HbA1c (basso, medio e alto) su pool di sangue intero (L1, L2, L3) e materiale di controllo BIORAD (B1, B2) messi a confronto con i dati di riproducibilità forniti dalla ditta produttrice. Dati espressi in mmol/mol (IFCC), tra parentesi sono riportati i rispettivi dati espressi in % (NGSP)

	Replicati = 5			Giorni = 5			Dati forniti dalla ditta produttrice (dati espressi in %)			
	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Valore di Verifica (V)
Livello basso										
L1	32,20 (5,09)	0,22 (0,02)	0,68 (0,39)							0,11
B1	36,39 (5,48)	0,57 (0,05)	1,57 (0,95)	5,76	0,09	1,62				0,12
Livello medio										
L2	51,21 (6,83)	0,88 (0,08)	1,72 (1,18)	7,07	0,09	1,28				0,13
Livello alto										
B2	81,94 (9,64)	1,13 (0,10)	1,38 (1,07)							0,24
L3	112,06 (12,40)	1,47 (0,13)	1,31 (1,08)	10,96	0,16	1,50				0,24

Clinica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Senese.

Lo studio è stato condotto in conformità con i principi etici sanciti nell'ultima revisione della Dichiarazione di Helsinki.

RISULTATI

I risultati delle misurazioni dei campioni L1, L2, L3 e B1, B2 sono riportati nella Tabella 1. La riproducibilità totale espressa in coefficiente di variazione percentuale (CV%) ottenuto per i pool di sangue intero L1, L2, L3 che costituiscono rispettivamente i livelli basso (media= 32,13 mmol/mol; 5,09%), medio (media= 51,15 mmol/mol; 6,83%) ed alto (media= 112,02 mmol/mol; 12,4%) di HbA1c è risultata essere rispettivamente di 0,39%, 1,18%, 1,08%.

Per quanto riguarda i materiali di controllo B1, B2 rappresentanti il livello basso (media 36,39 mmol/mol; 5,48%) e medio (media= 81,86 mmol/mol; 9,64%), il CV% è risultato essere 0,95% e 1,07% rispettivamente.

Sono stati inclusi nell'analisi tutti i campioni utilizzati per il confronto tra le due metodiche (n=250) senza escludere eventuali outliers.

L'analisi della regressione Passing-Bablok ha prodotto, per valori espressi in % (NGSP), un'intercetta di 0,10 intervallo di confidenza al 95% (95%IC)= -0,18–0,10) con una pendenza di 1,00 (95%IC= 1,00–1,05) (Figura 1a). La media dei risultati del metodo 8180V è risultata 6,28% (DS 1,24), inferiore al metodo in prova

Premier Hb9210 dove è risultata 6,45% (DS 1,31).

Considerando valori espressi in mmol/mol (IFCC) l'intercetta risulta -0,43 (95%IC= -1,27–0,75) con una pendenza di 1,05 (95%IC= 1,02–1,07). La media del metodo 8180V e del metodo Premier Hb9210 sono risultate 45,17 mmol/mol (DS 13,57) e 47,04 mmol/mol (DS 14,46) rispettivamente (Figura 1b).

Il bias ottenuto analizzando le differenze delle misure dei due metodi è risultato essere di -1,87 mmol/mol (IFCC) (95%IC= -4,33–0,58) e di -0,17% (NGSP) (95%IC= -0,39–0,05). Utilizzando il Bland-Altman Plot, nella Figura 2 vengono riportate la media dei due metodi (asse delle ascisse) e le differenze espresse in percentuale rispetto alla media dei metodi (asse delle ordinate). Il 95% delle differenze dei due metodi è compreso nell'intervallo tra -11,7% e 3,8% con un bias medio di -4% (calcolato su valori espressi in mmol/mol, IFCC) e nell'intervallo tra -7,5% e 2,3% con un bias medio di -2,6% (calcolato su valori espressi in % NGSP).

DISCUSSIONE

Nella prima fase dello studio è stata verificata la riproducibilità totale dello strumento in prova con quanto dichiarato dalla ditta produttrice. Successivamente si è passati ad effettuare il confronto tra i due metodi in esame. Tutta l'analisi statistica è stata effettuata considerando le due unità di misura attualmente utilizzate per la misura dell'HbA1c: % (NGSP) e

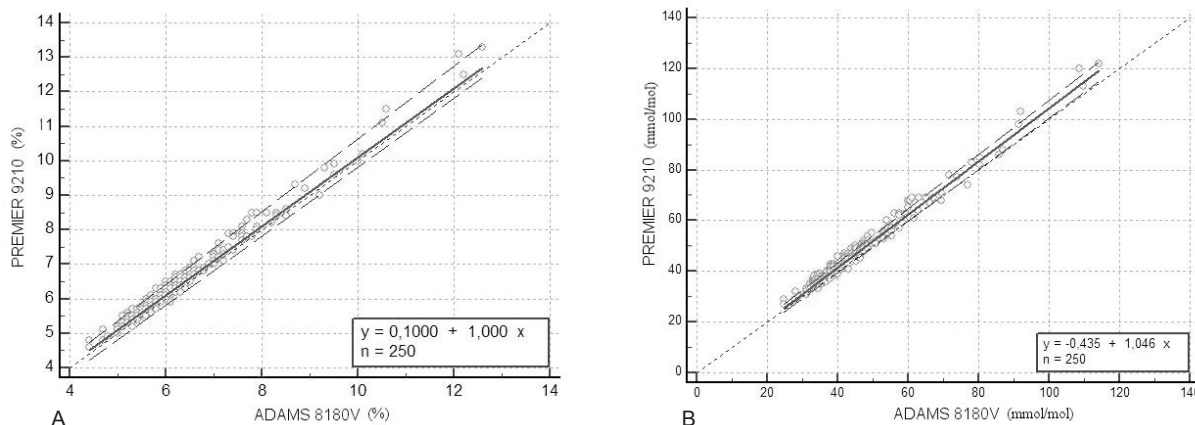


Figura 1
 Regressione non parametrica di Passing-Bablok per la comparazione dei metodi Premier HbPremier Hb9210 (asse y) e ADAMSTM A1c HA-8180V (asse x). Nel grafico sono riportate la linea di identità ($y=x$, linea punteggiata), la retta di regressione (linea continua) con l'intervallo di confidenza al 95% (linee tratteggiate). Valori sono espressi in % (pannello A) e in mmol/mol (pannello B).

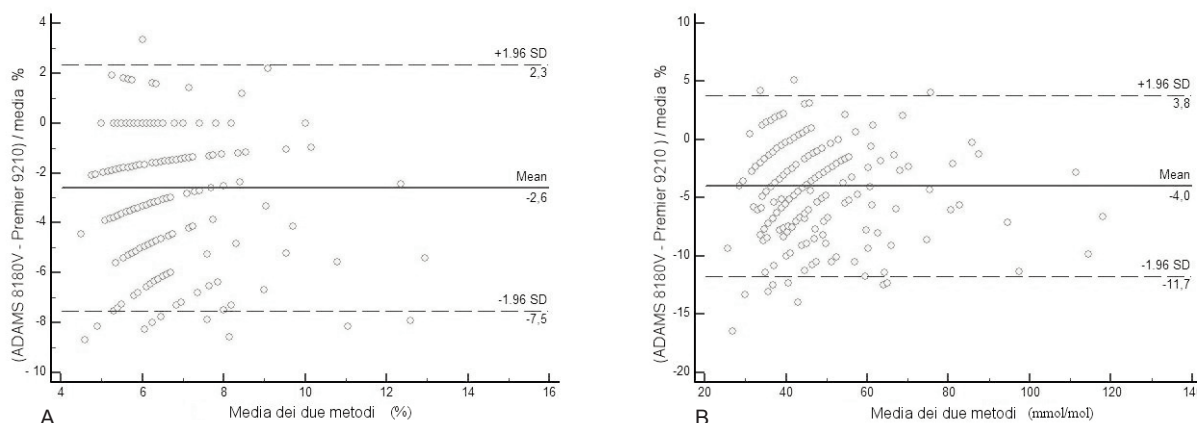


Figura 2
 Grafico Bland–Altman. Sono riportate la media dei due metodi (asse delle ascisse) per i valori % (NGSP) (pannello A) e mmol/mol (IFCC) (pannello B) e le differenze espresse in percentuale rispetto alla media dei metodi (asse delle ordinate).

mmol/mol (IFCC). Anche se a livello internazionale si è ormai concordi nell'utilizzo esclusivo della seconda unità di misura, vi sono ancora purtroppo molti laboratori che utilizzano solo la prima o entrambe.

Questo, se da una parte può derivare da una resistenza al cambiamento, dall'altra può essere imputato al fatto che riportare il risultato in percentuale ha un impatto visivo più immediato nell'ambito clinico.

Attualmente il panorama degli analizzatori e dei metodi utilizzati per la misura dell'emoglobina glicata è ampio, per questo è importante che ogni laboratorio possa verificare le caratteristiche delle strumentazioni offerte dalle ditte produttrici. Quanto riportato dalla ditta produttrice dello strumento HbPremier Hb9210, in termini di affidabilità strumentale e validità del dato, ha

portato ad effettuare una prova di confronto con l'HPLC a scambio ionico utilizzato di routine in laboratorio. Le Linee Guida fornite dalla comunità scientifica a tal scopo rappresentano il mezzo sempre più utilizzato dagli operatori del settore. Per l'analisi della HbA1c vi sono raccomandazioni e Linee Guida che suggeriscono un grado di imprecisione espresso in CV% massimo pari al 3% per quanto riguarda l'unità di misura IFCC (mmol/mol) e al 2% per l'unità di misura NGSP (%) (14,25,26). Lo studio ha evidenziato come lo strumento Premier Hb9210 rientri pienamente in questi limiti con CV totali da 0,68% a 1,72% (IFCC) e da 0,39% a 1,18% (NGSP). Questi valori ottenuti risultano in linea con quanto riportato in letteratura ed il confronto, in alcuni casi, fornisce un grado di imprecisione migliore (12).

Considerando i dati raccolti dalle misure espresse in % (NGSP), l'analisi della regressione di Passing-Bablok non ha mostrato una deviazione significativa dalla linearità ($p=0,08$) e non ha evidenziato la presenza di scostamento sistematico costante o proporzionale. Il bias ottenuto mette in luce una tendenza a produrre valori lievemente superiori da parte del metodo in prova Premier Hb9210. Anche considerando i dati espressi in mmol/mol non è stata evidenziata una deviazione significativa dalla linearità ($p=0,51$) ma l'analisi della regressione ha fatto emergere la presenza di un piccolo ma significativo scostamento proporzionale. Il bias ottenuto conferma la produzione di valori lievemente superiori del metodo in prova (Figura 3).

Osservando i Bland-Altman plots ed il Mountain plot vediamo chiaramente che la maggior parte dei valori ottenuti è al di sotto del valore 0 con un andamento uniforme per tutto l'intervallo di dati analizzato senza nessuna dipendenza dalle differenti concentrazioni dell'analita. Questo indica, come detto in precedenza, che lo strumento HbPremier Hb9210 tende a produrre valori di poco superiori su tutto l'intervallo analizzato, ragione plausibilmente attribuibile al fatto che la metodica di affinità al boronato riesce a misurare l'emoglobina glicata in toto (GHB) e non la sola HbA1c.

Possiamo comunque postulare che, utilizzando un metodo di screening, sia preferibile ottenere dati lievemente sovrastimati che, nei valori borderline, possono indirizzare il clinico verso una più attenta valutazione del soggetto in esame.

La semplicità di utilizzo, l'interpretazione del dato e la velocità di esecuzione dei campioni sono due fattori importanti nell'economia dei flussi di lavoro di un laboratorio con un numero cospicuo di campioni giornalieri da analizzare. L'utilizzo della cromatografia ad affinità al boronato, con la sua suddivisione in due sole frazioni emoglobiniche (glicata e non glicata), permette di ottenere risultati accurati in tempi brevi.

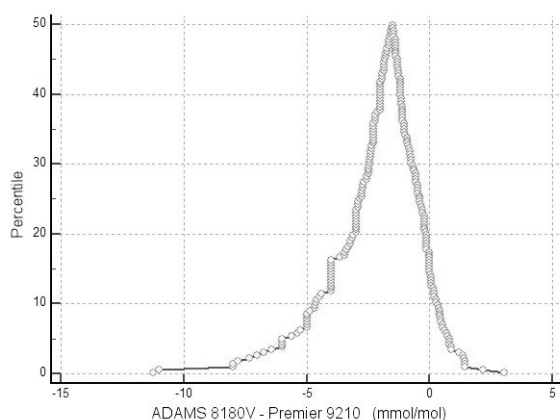


Figura 3
Rappresentazione grafica attraverso Mountain Plot delle differenze e del relativo percentile per valori espressi in mmol/mol.

Rimane aperta la discussione e il dibattito sull'utilizzo della tecnologia HPLC con il metodo boronato in una popolazione in cui, sempre più spesso, ci troviamo in presenza di varianti emoglobiniche.

L'aumento di persone provenienti dal Nord Africa e dal Sud Est asiatico che vivono nel nostro Paese ha di fatto cambiato la geografia delle emoglobinopatie che spesso vengono segnalate come reperto occasionale su soggetti asintomatici.

La scelta spetta dunque al laboratorio; la decisione è fra scegliere se sia più importante fornire un dato più preciso e non perdere i pazienti borderline o avere la possibilità, contestualmente ad un test di screening diabetologico, di fornire uno screening emoglobinico. Per ultimo, è opportuno tener conto che la disponibilità di entrambi gli strumenti permette di sopperire alle limitazioni dell'uno o dell'altro, soprattutto nei casi particolari e/o dubbi.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization, 2011. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70523> (ultimo accesso: agosto 2021).
2. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. London: Elsevier Health Sciences, 2012.
3. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
4. Hampson SE, Skinner T, Hart J, et al. Effects of educational and psychosocial interventions for adolescents with diabetes mellitus: a systematic review. *Health Technol Assess* 2001;5:1-79.
5. Nathan DM, Turgeon H, Regan S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia* 2007;50:2239-44.
6. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
7. Little RR, Rohlfing C, Sacks DB. The National Glycohemoglobin Standardization Program: Over 20 Years of Improving Hemoglobin A1c Measurement. *Clin Chem* 2019;65:839-48.
8. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327-34.
9. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement: the American Diabetes Association, European Association, for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. *Diabetes Care* 2007;30:2399-400.

10. Groche D, Hoeno W, Hoss G, et al. Standardization of two immunological HbA1c routine assays according to the new IFCC reference method. *Clin Lab* 2002;49:657-61.
12. John WG, Little R, Sacks DB, et al. Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:319-27.
12. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:1761-73.
13. Lenters-Westra E, Slingerland RJ. Six of eight hemoglobin A1c point of care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria. *Clin Chem* 2010;56:44-52.
14. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-e99.
15. Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:446-51.
16. Abraham EC. Glycosylated hemoglobins: methods of analysis and clinical applications. New York: Marcel Dekker, 1985:91-171.
17. Fluckiger R, Mortensen HB. Glycated haemoglobins. *J Chromatogr* 1988;429:279-92.
18. Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, et al. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits. *Clin Chem* 2005;51:264-5.
19. Rohlfing C, Connolly S, England J, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on HbA1c results: five common HbA1c methods compared to the IFCC reference method. *Am J Clin Pathol* 2008;129:811-4.
20. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, et al. NGSP Steering Committee. The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report. *Clin Chem* 2001;47:1985-92.
21. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
22. Pradella M, Cesana BM. Linee guida per il confronto di procedure di esami di laboratorio: utilizzo delle indicazioni di CLSI EP09-A3 ed EP31-A-IR. *Riv Ital Med Lab* 2016;12:26-35.
23. ISO15189:2017 Medical laboratories: requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2017.
24. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline, 3rd edition. CLSI document EP09-A3. CLSI Wayne, PA, 2013.
25. Weykamp CW, Mosca A, Gillery P et al. The analytical goals for hemoglobin (A1c) measurement in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units are different. *Clin Chem* 2011;57:1204-6.
26. Goodall I, Colman PG, Schneider HG et al. Desirable performance standards for HbA(1c) analysis - precision, accuracy and standardization: consensus statement of the Australasian Association of Clinical Biochemists (AACB), the Australian Diabetes Society (ADS), the Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA), Endocrine Society of Australia (ESA), and the Australian Diabetes Educators Association (ADEA). *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1083-97.

Performance evaluation of ARKRAY HA-8190V system for measuring glycated hemoglobin

Renata Paleari^{1,2}, Ferruccio Ceriotti², Andrea Mosca¹

¹Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano

²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ABSTRACT

Introduction: the new fully automated HPLC ion-exchange system ADAMS A_{1c} HA-8190V analyzer, developed by ARKRAY Inc., running in two different modes (Variant and Fast) has been evaluated.

Methods: reproducibility was evaluated according to the EP-15A3 standard. Method comparison was performed on 122 fresh blood samples, according to the EP-9 standard. The system was compared to 3 other HPLC analyzers, based on ion-exchange (Tosoh G11 and Bio-Rad D-100) and boronate affinity chromatography (Trinity Biotech Premier Hb9210). Usability was evaluated by using a score evaluation system.

Results: reproducibility proved to be very good at normal and high HbA_{1c} concentration, with total CVs always <0.7 %, when HbA_{1c} was expressed in mmol/mol as well as in % units. The HA-8190V system was well correlated to the other HPLC analyzers, with a mean bias not clinically relevant. Finally, the usability of the system was evaluated and proved to be well acceptable.

Conclusions: the ARKRAY HA-8190 V system was found to be a reliable and suitable method for routine HbA_{1c} measurement in clinical chemistry laboratories.

Keywords: HbA_{1c}, diabetes, boronate affinity chromatography

INTRODUCTION

Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) testing has a central role in the evaluation and management of diabetes mellitus. Traditionally, it is used to monitor the retrospective glycaemic control of patients, to evaluate the risk of developing long-term complications and to make decisions concerning therapy. More recently, it is also used for the diagnosis and screening (1,2), as well as an important step in screening for gestational diabetes (3).

The importance of HbA_{1c} in diabetes management is well recognized by the diagnostic industry and many commercial methods are available to determine the HbA_{1c} concentration. They are essentially based on two principles, one consisting in electric charge differences (ion-exchange HPLC, capillary electrophoresis) and the

other in structural differences (boronate affinity chromatography, immunochemical and enzymatic assays) between HbA_{1c} and other non-glycated forms of hemoglobin (4).

Whatever the assay method used, it is required to be standardized and to achieve a high degree of analytical performance, possibly near to the recommended goals (5), due to the important clinical decisions based on HbA_{1c} results. Moreover, it is known from epidemiological data that the diabetes prevalence has been rising in recent decades worldwide (6), so the usability characteristics of the analytical systems are important issues to take into account because of the increasing number of tests daily requested to the laboratories.

ARKRAY HA-8190V is a recently developed HPLC

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20054 Segrate (MI), E-mail andrea.mosca@unimi.it

Received: 21.09.2021

Revised: 06.10.2021

Accepted: 07.10.2021

Published on-line: 26.10.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.069

analyzer for the measurement of HbA_{1c}. We have performed an evaluation of the main analytical performances of this new instrument and report here the results of the reproducibility and method comparison studies as well as some usability aspects.

METHODS

ADAMS A1c HA-8190V

HA-8190V is a fully automated bench-top HbA_{1c} analyzer using the principle of cation-exchange HPLC for HbA_{1c} separation and quantification. The instrument has two modes of operation for the measurement of HbA_{1c}, the Fast mode (runtime 24 s; variant hemoglobins are not separated) and the Variant mode (runtime 58 s; variant hemoglobins are separated). Switching between the two modes does not need the change of any reagents or column. A two-points calibration is used, and results are reported in both mmol/mol and % units. A typical separation pattern is shown in Figure 1.

Samples

Patient samples consisted of EDTA anticoagulated blood samples, freshly collected from left-over material of the laboratory HbA_{1c} routine assay and anonymized before their use. They were tested using Bio-Rad D-100 and Hb variant blood samples were excluded from this study. Quality control and calibration materials were provided by the manufacturers of the different tested analyzers and used according to their instructions.

Reproducibility study

The reproducibility study was performed according to CLSI EP-15A3 standard. Over five consecutive days, two control materials (level 1 and level 2 supplied by ARKRAY), together with three whole blood pools having increasing concentrations of HbA_{1c} (pool 1: physiological level; pool 2: moderately high; pool 3: high) were analyzed. The three blood pools were prepared by mixing fresh blood samples. Once prepared, they were divided in aliquots and stored at -80 °C until the analysis.

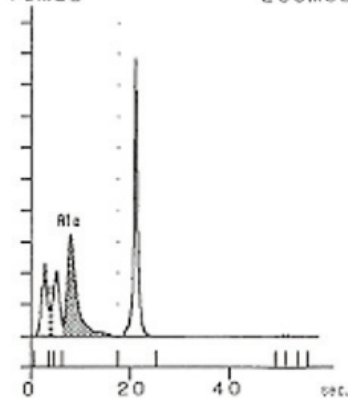
```
*** HA-8190V V01.07 ***
31-03-2021 11:28 Var.
R. mis. 0011 N. sorta 0001 Int
ID Seal 17387267-----
```

```
HbA1c 47.1 mmol/mol
HbA1c 6.46%
HbF 0.36%
```

	sec.	Press. 47.6 kg/cm ²	Valore area	%
P1	2.80	665	2.32	
P2 F	4.00	104	0.36	
P3 #C	5.20	507	1.77	
P4 A1c	7.95	1865	6.51	
P5 A0	20.95	25608	89.08	

P6	37.55	200	--	--
P7	50.70	10	--	--
P8	51.75	160	--	--
P9	55.75	0	--	--
Valore area totale		28749		

```
H 225 TAIL 28
PRS 47.6 #C TAIL 0.527
A1c 6.49 NonF 6.46
16mDD 299mDD
```



```
*** HA-8190V V01.07 ***
31-03-2021 12:51 Fast
R. mis. 0043 N. sorta 0001 Int
ID Seal 17387267-----
```

```
HbA1c 47.1 mmol/mol
HbA1c 6.46%
HbF 0.36%
```

	sec.	Press. 48.4 kg/cm ²	Valore area	%
P1	2.90	641	2.33	
P2 F	4.05	99	0.36	
P3 #C	5.30	492	1.79	
P4 A1c	8.10	1805	6.56	
P5 A0	17.65	24575	89.00	
Valore area totale		27612		

```
H 225 TAIL 28
PRS 48.4 #C TAIL 0.536
A1c 6.49 NonF 6.46
16mDD
```

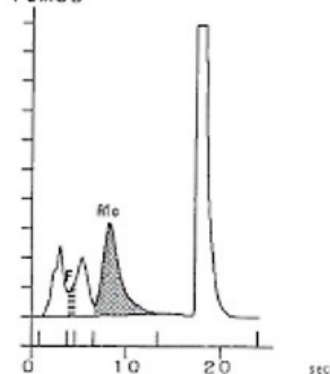


Figure 1

Typical chromatograms obtained, for the same blood sample, using HA-8190V operating in Variant (left) and Fast (right) mode.

The tests were carried out in both Variant and Fast mode.

Method comparison study

HbA_{1c} results obtained with HA-8190V using both Variant and Fast mode, were compared to the results obtained with three different HPLC systems, i.e. Bio-Rad D-100 and Tosoh G11 both based on ion-exchange chromatography and Trinity Premier Hb-9210 based on boronate affinity chromatography.

A total of 122 blood samples, selected to be distributed across the entire physio-pathologic HbA_{1c} range, were used for the comparison study. Blood samples were stored at 4 °C until the analysis was performed within 24-48 hours from the collection. The comparisons were carried out in several analytical sessions by analyzing a series of 30 blood samples over a period of about one month. At the beginning and at the end of each analytical session, two control materials (at low and high HbA_{1c} levels) supplied by the manufacturers of all the tested HPLCs were analysed. All the methods were run and calibrated according to the manufacturer's instructions. In particular, for ARKRAY HA-8190V, Bio-Rad D-100 and Tosoh G11 it was carried out only once at the beginning of the comparison study, while for Trinity Premier Hb9210 at the beginning of each analytical session.

Usability

Usability has been evaluated by two independent users, taking into account automation and user interface, throughput, calibration requirements, sample and reagents management, maintenance needs and the overall user-friendliness of the system. A score was given to the various aspects of the evaluation, by making a comparison with the other systems used in this study.

Statistical analysis

The results of the reproducibility study were elaborated by the ANOVA analysis. The results of the method comparison study were evaluated by using the non-parametric regression model according to Passing-Bablok and the Bland-Altman analysis. The statistical package MetComp ver. 1.0 (SIBioC, Italy) was used for all statistical tests.

RESULTS

Reproducibility

The reproducibility parameters as investigated by CLSI EP-15A3 protocol are listed in Table 1. For results expressed in mmol/mol (Table 1A) and operating in Variant mode, an excellent reproducibility was found with within-run CVs of 0.5 - 0.7 %, between-run CVs of 0.2 - 0.4% and

Table 1

Reproducibility of HbA_{1c} assay by ADAMS A1c HA-8190V operating in Variant and Fast mode. CV values were calculated from HbA_{1c} results expressed in SI (A) and in % (B) units.

A	Control L	Control H	Pool 1	Pool 2	Pool 3
Variant mode					
Mean (mmol/mol)	33.76	102.92	36.21	55.12	76.15
CV-within run (%)	0.59	0.56	0.67	0.45	0.51
CV-between run (%)	0.35	0.31	0.28	0.23	0.37
CV total (%)	0.63	0.58	0.66	0.47	0.58
Fast mode					
Mean (mmol/mol)	31.61	98.11	35.80	55.05	76.05
CV-within run (%)	0.50	0.28	0.30	0.30	0.21
CV-between run (%)	0.45	0.32	0.41	0.21	0.17
CV total (%)	0.64	0.41	0.49	0.34	0.26
B	Control L	Control H	Pool 1	Pool 2	Pool 3
Variant mode					
Mean (%)	5.24	11.57	5.46	7.19	9.12
CV-within run (%)	0.31	0.45	0.40	0.31	0.38
CV-between run (%)	0.17	0.23	0.18	0.17	0.30
CV total (%)	0.33	0.47	0.40	0.33	0.45
Fast mode					
Mean (%)	5.04	11.13	5.43	7.19	9.11
CV-within run (%)	0.32	0.22	0.17	0.22	0.16
CV-between run (%)	0.28	0.25	0.20	0.15	0.12
CV total (%)	0.40	0.32	0.26	0.25	0.19

a total imprecision between 0.5 - 0.7%. Using the Fast operation mode, the reproducibility was even better, with total CVs between 0.3 and 0.6%. The CV values obtained for results expressed in % units are detailed in Table 1B.

Method comparison

The linear regression parameters from Passing & Bablok analysis together with the mean bias obtained in the comparison studies are shown in Table 2.

Bland-Altman plots of differences between the HA-8190V and the other tested HPLC methods are shown in Figure 2.

Table 2

Passing-Bablok regression parameters and mean bias (method y – method x) calculated from the method comparison study for HbA1c assay expressed in SI (A) and in % (B) units.

A	Method x	Method y	n	Intercept (95% CI)	Slope (95% CI)	Mean bias (95% CI)
	Bio-Rad	ARKRAY V	122	0.527 (-0.257+1.290)	0.998 (0.980+1.014)	0.50 (0.25+0.74)
	Tosoh	ARKRAY V	122	-0.292 (-0.875+0.265)	1.004 (0.992+1.018)	0.00 (-0.20+0.20)
	Trinity	ARKRAY V	121	-1.457 (-2.335+ -0.567)	0.987(0.967+1.006)	-2.05 (-2.37+ -1.74)
	ARKRAY F	ARKRAY V	122	-0.349 (-0.617+ -0.050)	1.007 (1.000+1.012)	-0.05 (-0.13+0.03)
B	Method x	Method y	n	Intercept (95% CI)	Slope (95% CI)	Mean bias (95% CI)
	Bio-Rad	ARKRAY V	122	0.054 (-0.054+0.161)	0.998 (0.980+1.014)	0.05 (0.02+0.07)
	Tosoh	ARKRAY V	122	-0.035 (-0.118+0.042)	1.004 (0.992+1.018)	0.00 (-0.02+0.02)
	Trinity	ARKRAY V	121	-0.106 (-0.226+0.020)	0.987(0.967+1.006)	-0.19 (-0.22+ -0.16)
	ARKRAY F	ARKRAY V	122	-0.046 (-0.082+ -0.005)	1.007 (1.000+1.012)	-0.01 (-0.01+0.00)

CI, Confidence interval; F, Fast mode; V, Variant mode.

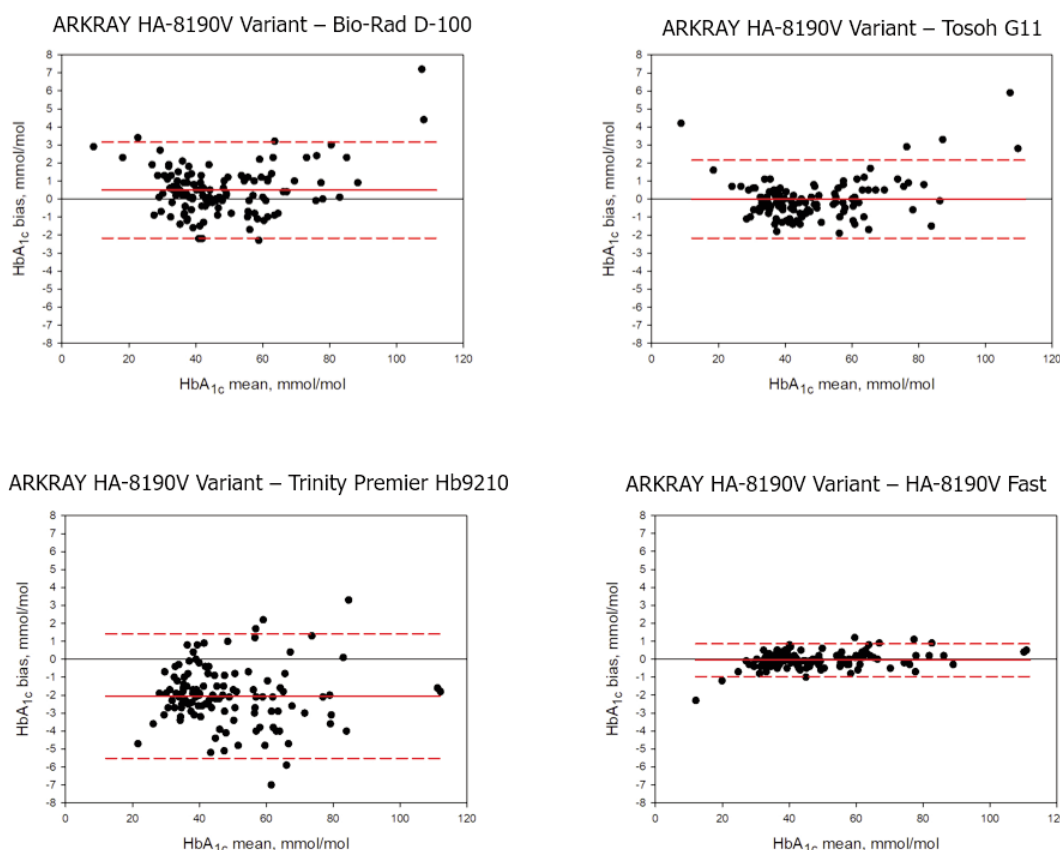


Figure 2

Bland-Altman difference plots showing the absolute bias between HbA_{1c} results obtained with HA-8190V Variant mode and the other tested methods. On the x-axis, the average of HbA_{1c} values obtained with the couples of methods is reported. Mean bias (red solid line) and 95% range of differences (dashed lines) are indicated.

The results obtained with the HA-8190V operating in Variant mode were almost equivalent to those obtained in Fast mode, also considering that no hemoglobin variants were present in the blood samples. For this reason, only the results obtained with the Variant mode were used for the comparisons.

The HA-8190V was perfectly aligned to both Bio-Rad D-100 and Tosoh G11 systems, as proven by the intercept and slope values not statistically different from 0 and 1, respectively, in both comparisons. A slight but significant systematic negative bias was detectable between ARKRAY HA-8190V and Trinity Premier Hb9210 (mean bias = -2.0 mmol/mol).

Usability

The HA-8190V was found to be a very easy-to-use analyzer. Its main usability characteristics are reported in Table 3. Among the features which were evaluated, the

possibility of switching to the Fast mode for samples previously analyzed, time savings in not having to align the barcoded tubes and the user-friendly software were particularly appreciated. In summary, the results of the usability study show that the instrument is rated to be acceptable in all cases.

DISCUSSION

In this study, we have evaluated the HA-8190V, a recently developed HbA_{1c} analyzer from ARKRAY. Our work integrates a previously published evaluation (7) without any overlap. Indeed, in the first one the ADAMS A1c HA-8190V has been compared to the previous version from the same company, i.e. to the HA-8180V system, and the Trinity analyzer has been used to verify the HbA_{1c} when Hb variants were present, which were not enrolled in this present evaluation.

Table 3

Usability characteristics of ADAMS A1c HA-8190V. The score is reported according to the average of the two evaluators, who were familiar with the other instrumentation used in the present study. Score (see text): A, optimal; B, good; C, on the average; D, poor.

Attribute	Contents	Score
Throughput	62 tests/h in the Variant (V) mode; 150 tests/h in the Fast (F) mode	B (V) A (F)
Reagent handling	Reagents placed in light aluminum bags avoiding influence of sunshine/algae growth	A
	Barcode on each reagent contains all the needed information about lot and expiry date, entered by a manual barcode reader Reagent changing can also be done during the run	A
	Sample processing	Primary capacity of 100 samples, with optional side sampler up to 200
Sample processing	Sampling either from primary tubes with cap piercing and ID scanning for blood patient samples, or from cups for hemolysates	A
	Specific racks for whole blood, anemic samples and hemolysates, automatically recognized	A
	Stirring of the tube before the analysis and automatic barcode reading of freely placed, non-aligned barcoded samples	A
	Possibility to insert urgent samples (STAT)	A
	Result processing	Warnings in case of abnormal results, variant detection, low hemoglobin
Result processing	On-board memory allows the storage of 900 results including chromatograms, calibration and control information	B
	Calibration	Normally required only after the installation of a new column (once every 4000 tests with no pre-filter change)
Quality control	Alarms in case of QC fails/falls outside the given range	A
Software	Touchscreen software with pull-down menus Friendly interface allowing an intuitive scrolling through pages	A
Start-up and shut-down procedure	The start-up time (30 min) can be programmed, the shut-down is automatic	A
Maintenance	No particular daily maintenance, a 7 minutes washing procedure is needed weekly	B

The precision study performed at different HbA_{1c} levels on both blood samples and control materials revealed excellent performance. The CV values for all the different components of reproducibility, never exceeded 0.7% for results expressed either in mmol/mol or % units. This result is far below the most stringent goals for reproducibility for HbA_{1c} assay [$<2.8\%$ in SI units; $<2.0\%$ in the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) units] (8) and is in accordance with the results reported in a previous evaluation (7).

A very good agreement was found between HbA_{1c} values obtained with ARKRAY HA-8190V analyzer and other frequently used routine HPLC methods. In particular, in the comparison with both Bio-Rad D-100 and Tosoh G11 an excellent concordance was found with no statistically significant differences in the results. In the comparison between ARKRAY HA-8190V and Trinity Premier Hb9210, a slight negative bias was found, though of no clinical relevance.

Other aspects concerning the general performance of the system, such as linearity, carry-over, sample stability and trueness were not among the scopes of our work, because they have already been previously evaluated by Van der Hagen et al. (7).

In conclusion, the HA-8190V exhibits excellent reproducibility, good comparability with other routine methods currently available, high throughput and convenient usability features. These characteristics make it a reliable and suitable method for routine HbA_{1c} measurement in clinical chemistry laboratories.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Dr. B. Saeger, Mr. L. Hendrick (ARKRAY Europe B.V., The Netherlands) for having supported the study, and Mr. K. Higashino (ARKRAY Inc., Japan) and Mr. F. Peschiera and Mr. C. Sattari (ARKRAY Italia S.R.L., Italy) for their kind and skillful technical assistance. We acknowledge also Dr. F. Agostara (A. Menarini, Italy), Dr. S. Frediani (Tosoh Bioscience, Italy) and Dr. S. Marivoet (Tosoh, Belgium) for having provided the G11 and reagents at no cost for this evaluation.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Higgins T. HbA_{1c} - An analyte of increasing importance. *Clin Biochem* 2012;45:1038-45.
2. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-99.
3. Arbiol-Roca A EA, Pérez-Hernández EA, Aisa-Abdellaoui N, et al. The utility HbA_{1c} test as a screening biomarker for detecting gestational diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2021;90:58-61.
4. Weykamp C. HbA_{1c}: A Review of Analytical and Clinical Aspects. *Ann Lab Med* 2013;33:393-400.
5. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA_{1c} measurement. *Clin Chim Acta* 2013;418:63-71.
6. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138:271-81.
7. Van der Hagen EAE, Leppink S, Bokkers K, et al. Evaluation of the ARKRAY HA-8190V instrument for HbA_{1c}. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:965-70.
8. Weykamp CW, Mosca A, Gillery P, et al. The analytical goals for hemoglobin A_{1c} measurement in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units are different. *Clin Chem* 2011;57:1204-6.

Ethics in Laboratory Medicine: lessons from the COVID-19 pandemic

Mario Plebani

Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Italy

ABSTRACT

Professional societies in many countries have developed ethics policies and guidance materials for laboratory medicine which, just like any other area of medicine, must adhere to high ethical standards in order to assure quality and safety in health care. 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. However, the COVID-19 pandemic has raised the awareness of the urgent need to reassess and update ethical codes, and has highlighted current challenges and critical issues, such as access to diagnostics and laboratory testing, the value of laboratory information and the need for well-integrated diagnostic information. In the present paper, proposals are made for the updating of ethical codes currently required in laboratory medicine.

Keywords: Ethics, COVID-19, ISO 15189

INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), a major healthcare challenge, is a worldwide threat to public health, social stability, and economic development. The pandemic has not only affected all facets of society, dramatically changing individuals' day-to-day lives and habits, but has also changed clinical practice, including that of clinical laboratories (1). It has, moreover, highlighted stark disparities in access to health care services, laboratory medicine in particular, thus giving rise to the need for a new public health ethics framework based on principles allowing transparency and consistency in public health decision-making, and assuring better clinical outcomes to individuals and the community at large (2). Historically, the crucially important role of diagnostics, particularly laboratory testing, in the provision of good health care has been underestimated and under-resourced. Yet the COVID-19 pandemic has highlighted the importance of prioritizing diagnostics (3). Without access to affordable, high-quality laboratory diagnostics, it is impossible to allocate effective patient care (preventative, urgent, intensive and acute care included).

The challenges of allocation are particularly apparent in communities persistently deprived of access to care and consequently suffering from an increased prevalence of chronic conditions: in 2018, the Lancet Commission on Diagnostics reported that access to diagnostic testing in Pathology and Laboratory Medicine (PALM) was poor and inequitable in many parts of the world, the diagnostic gap being most severe in primary health care, only about 19% of low and lower-middle-income (LMICs) populations having access to the simplest of diagnostic tests. The authors estimated that a reduction in the diagnostic gap for the six tracer conditions suggested by the WHO (from 35-62% to 10%) would reduce the annual number of premature deaths in low and middle-income countries by 1.1 million, and the annual disability-adjusted life-year losses by 38.5 million (4). A study published in 2021 reported evidence collected on the diagnostic accuracy, cost-effectiveness and utility of laboratory test strategies for COVID-19 in low and middle-income countries, and a proposal was made for rapid evidence synthesis (5). The COVID-19 pandemic has therefore generated the opportunity to better address the fundamental ethical

Per un'ampia fruibilità di questa opinione è fornita la traduzione in Italiano quale materiale supplementare (1S)

Corresponding Author: Mario Plebani, Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Italy

Received: 11.01.2022

Revised: 12.01.2022

Accepted: 12.01.2022

Published on-line: 18.01.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.002

principles designed to govern laboratory medicine, with access to affordable, high-quality laboratory diagnostics, and a reversal of the view of the clinical laboratory as a commodity.

In recent years, consolidation, merger, and laboratory downsizing have been driven by the need to deliver economies of scale and to cut costs per test while boosting productivity. Distorted economics, based on payment models rewarding volumes and efficiency rather than quality and clinical effectiveness, have underpinned the entrance of clinical laboratories into the mass production industry, forcing them to relinquish their original mission of providing medical services (6). However, the COVID-19 pandemic has highlighted the challenge of resource allocation and ethical duties, in particular, the duty to act in the best interest of patients, and to ensure respect for individuals, pointing to the need for all laboratory professionals to take these issues into greater consideration. As recently highlighted by Cullen M, et al. (7) *“though select members in the field (laboratory medicine) have advocated for an enhanced presence of these specialists in policy conversations, little work has been done to thoroughly evaluate the moral and ethical obligations of the pathologist and the role they play in healthcare justice and access to care”*.

Ethics in laboratory medicine is a long neglected issue, despite papers in the literature and the valuable work undertaken by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Task Force on Ethics. In the last few decades, the focus on technological and analytical issues has caused laboratorians to overlook the role of the profession in the context of medicine and healthcare systems. As already reported (8) *“thanks to the longstanding focus on the analytical performances of laboratory tests, we have lost sight of the outcomes of laboratory information”*.

TOWARDS A NEW CODE OF ETHICS FOR LABORATORY PROFESSIONALS

The publication of ISO 15189:2012 "Medical laboratories – Requirements for quality and competence" by the International Organization for Standardization (ISO) (9) was a milestone in the promotion of ethics in laboratory medicine. Section 4.1.1.3 of this unique, internationally recognized standard for medical laboratories accreditation, summarizes the ethical conduct expected by laboratories, stating that laboratories should have means in place to ensure that:

- there is no involvement in any activities that would diminish confidence in the laboratory's competence, impartiality, judgment or operational integrity;
- management and personnel are free from any undue commercial, financial, or other pressure and influences that may adversely affect the quality of work;
- where potential conflicts in competing interests exist, they shall be openly and appropriately declared;

- there are appropriate procedures to ensure that staff treat human samples, tissues or remains according to relevant legal requirements;
- confidentiality of information is maintained.

These requirements focusing on the need to avoid conflict of interest that can undermine the best interests of patients, protect patient information and comply with national and/or international legal requirements, are similar to other code lists developed by Scientific Societies and Associations, as aptly summarized by Richard X. (10). Basic principles that must also be applied to the field of clinical laboratories and laboratory medicine are: respect for persons; beneficence; and justice, as described in the Belmont report, a pivotal work on ethics and healthcare research (11). The ethical duties of a laboratory professional have been described as distinct from other patient-facing specialties. Indeed, some authors continue to maintain that in a clinical laboratory *“there is no direct contact with patients...and the faceless laboratory physician's first and foremost duty is to act in the best interest of the 'faceless' patient who is often 'just a number' ”* (12). According to this viewpoint, the relationship between laboratory professionals and patients is important, but *“the relationship between the laboratory professional and clinician is more important”* (12). Before the pandemic, several documents, papers and initiatives emphasized the importance of laboratory testing in numerous clinical pathways (13), but the pandemic further raised awareness of the essential contribution made by clinical laboratories to diagnostic reasoning and patient management, making the value of laboratory testing more visible to the lay public. Therefore, thanks to the visibility gained from the pandemic, we should not miss the opportunity to provide further evidence of the key role played by the laboratory in modern, personalized medicine, and on the ethical principles pertaining to.

First and foremost, it is important for laboratory professionals to share common medical duties with their “patient-facing” colleagues, thus playing an effective and clinical proper role in the healthcare system, this role being to steward resources and ensure that diagnostic tests are accessible, while preventing any unnecessary, obsolete and/or inappropriate tests being ordered. Likewise, laboratory professionals should provide advice for the right interpretation and utilization of laboratory information, thus contributing to improvement in the effectiveness and sustainability of laboratory services (14,15). This innovative moral stance, which would counteract the vision of laboratory medicine as a simple diagnostic commodity, should restore its true nature as an essential medical service; it is, moreover, the backbone to the implementation of novel programs, such as those undertaken by Diagnostic Management Teams, which should ultimately improve diagnostic-therapeutic pathways and clinical outcomes. As stressed by Cullen M, et al (7) *“the issue of justice in laboratory medicine*

can be understood as a multifaceted and complex issue which requires enhanced advocacy and physician education on selective ordering..., amended reimbursement schemes and growth of the laboratory workforce". Laboratory professionals must inform physicians of changes in best practices, and the appropriate use of innovative tests with evidence-based diagnostic efficiency, thus making it possible to improve on the use of economic resources at a population level.

Laboratory professionals should further raise awareness that 47% of the global population has little or no access to diagnostic services (4). In view of the fact that laboratory testing is central and fundamental to quality health care, a reduced diagnostic gap should lead to a relevant reduction in morbidity and mortality worldwide. Therefore, all laboratorians have the moral obligation to transform and improve access to diagnostics as a fundamental part of a healthcare system, while taking into consideration aspects such as financing, workforce, technology and governance. In striving to improve access to diagnostics, it is of fundamental importance to recognize the role of point-of-care (POCT) and near-patient testing as these technologies, with their many advantages (e.g. patient-centeredness, rapidity, lower staff requirements and avoidance of sample transport issues) are conducive to maximizing access to diagnostics in low- and middle-income countries (3). In addition, smart and user-friendly wearable devices not only help people to pursue a healthier lifestyle, but also provide a continuous flow of healthcare data for disease diagnosis and treatment by actively recording physiological parameters and tracking metabolic state (16). The integration of all diagnostic information represents a challenge that laboratory professionals should take into closer consideration.

Closely related to the above point, is the need to ensure diagnostic safety and quality to prevent the risk of harming patients and wasting resources. Extended access to poor-quality laboratory testing is questionable and counterproductive. The lesson learned in the last few decades is that quality should be provided not only in the intra-analytical, but also in the extra-analytical

phases (17), all steps being monitored with valuable and harmonized quality indicators (18). In addition, efforts must be made to achieve integration between all laboratory medicine sub-disciplines, according to the PALM concept (19) in order to provide clinicians with comprehensive and complete laboratory reports and all necessary information. Ultimately, integration with imaging information should be promoted. In fact, convergence of imaging, pathology and laboratory tests with advanced information technology, has an enormous potential for revolutionizing diagnosis and therapeutic management of human diseases, including those causing the highest mortality worldwide (i.e. cardiovascular disease, cancer and infectious diseases) (13).

Laboratory professionals, particularly in this era of increased access to molecular and genetic information, should serve as guardians of patient data, should protect patient information and avoid the practice of carrying out tests without the patients' consent, and of using stored samples without obtaining patients' fully informed consent (20-23). Laboratory professionals should ascertain that informed consent has been given by the patient for particularly "critical tests" (e.g. drug screening, pregnancy and genetic tests) in the pre-analytical phase and should guarantee confidentiality of test results within the patient's care circle in the post-analytical phase.

Laboratory professionals are morally obliged to assure the comparability of laboratory information across time, across different laboratories and across different diagnostic systems. Patients must be freed from the recommendation that they should always refer to the same laboratory so as to receive comparable results. In view of reasons such as occupation, family and vacation times, patients should be enabled to receive interchangeable results from laboratories in different locations. In an era of globalization, a patient-centered service should assure comparability of laboratory results through harmonization and standardization programs (24).

Table 1 lists the reported key ethical duties in laboratory medicine.

Table 1

Key actions for ethics in laboratory medicine; laboratory professionals should improve:

- interaction between laboratory professionals, patients and clinicians;
- stewardship for accessibility, correct test requesting and interpretation of results
- access to diagnostics (laboratory testing, in particular), while ensuring quality and safety;
- integration and consolidation of diagnostic data/information;
- guardianship of patient data and ensure correct use of human samples;
- comparability of laboratory results and information (harmonization/standardization).

CONCLUSION

In the present era of “hi-tech” laboratory medicine, it is of crucial importance to maintain high ethical standards in laboratory practice as the ethical dilemmas being faced by laboratory professionals are increasing. The COVID-19 pandemic has provided a window of opportunity to review and update current ethical codes, highlighting current challenges and critical issues, such as access to diagnostics and laboratory testing, the current value of laboratory information and the need for better integration of diagnostic information. In particular, evidence collected confutes the concept that laboratory medicine is inherently isolated from patients; *vice versa*, patient interaction as well as closer interaction between laboratorians and physicians is an increasingly important part of their professional goals and ethical duties (25).

A recently published paper investigating whether the assistance of a technologist in the bedside preparation of bone marrow specimens, demonstrated a significant improvement in sample quality (26), thus reinforcing the view that it is important for laboratory professionals to work as members of multidisciplinary healthcare teams. An accompanying editorial, appropriately entitled “The lab as a driver of quality in the preanalytical realm”, reported new evidence of the need to provide advice and cooperation in several phases of the testing process (27). As previously reported in a paper published on ethics in laboratory medicine (28), the Latin aphorism *malum quidem nullum esse sine bono* (not all evil causes harm), should help laboratory professionals learn some lessons from the COVID-19 pandemic, lessons enabling them to enhance their practice, and improve upon ethical aspects. The above reported ethical duties constitute a proposal that national Scientific Societies, International Federations of Laboratory Medicine (e.g. IFCC and EFLM) and other professional organizations should take into account in the interests of developing a more comprehensive and updated code of ethics in laboratory medicine.

CONFLICT OF INTERESTS

None.

REFERENCES

1. Plebani M. Laboratory medicine in the COVID-19 era: six lessons for the future. *Clin Chem Lab Med* 2021 doi: 10.1515/cclm-2021-0367. Epub ahead of print.
2. Maeckelberghe E. COVID-19: opportunities for public health ethics? *J R Coll Physicians Edinb* 2021;51:S47-52.
3. Fleming KA, Horton S, Wilson ML, et al. The Lancet Commission on diagnostics: transforming access to diagnostics. *Lancet* 2021;398:1997-2050.
4. Sayed S, Cherniak W, Lawler M, et al. Improving pathology and laboratory medicine in low-income and middle-income countries: roadmap to solutions. *Lancet* 2018;391(10133):1939-52.
5. Ouma OK, Ephraim K, Loyce N, et al. Role and utility of COVID-19 laboratory testing in low-income and middle-income countries: protocol for rapid evidence synthesis. *BMJ Open*. 2021;11(10):e050296.
6. Plebani, M. Clinical laboratories: production industry or medical services? *Clin Chem Lab Med* 2015;53:995-1004.
7. Lilley CM, Mirza KM. Critical role of pathology and laboratory medicine in the conversation surrounding access to healthcare. *J Med Ethics* 2021. doi: 10.1136/medethics-2021-107251. Epub ahead of print.
8. Plebani M. Competent well-trained phlebotomists. *Am J Clin Pathol*. 2021 doi: 10.1093/ajcp/aqab193. Epub ahead of print.
9. ISO 1589:2012. Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2012.
10. Davey RX. Codes of ethics for laboratory medicine: definition, structure and procedures - A narrative review based on existing national codes. *EJIFCC* 2020;31:262-73.
11. The National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research. Ethical Principles and Guidelines for the Protection of Human Subjects of Research. <https://www.hhs.gov/ohrp/regulations-and-policy/belmont-report/read-the-belmont-report/index.html>. (last accessed: January 2022)
12. Wijeratne N, Benatar SR. Ethical issues in laboratory medicine. *J Clin Pathol* 2010;63:97-8.
13. Lippi G, Plebani M. Integrated diagnostics: the future of laboratory medicine?. *Biochem Med* 2020;30:010501.
14. Plebani M. Clinical laboratory: bigger is not always better. *Diagnosis (Berl)* 2018;5:41-6.
15. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
16. Xie Y, Lu L, Gao F, et al. Integration of artificial intelligence, blockchain, and wearable technology for chronic disease management: A new paradigm in smart healthcare. *Curr Med Sci* 2021;41:1123-33.
17. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem* 2010;47:101-10.
18. Aita A, Sciacovelli L, Plebani M. Extra-analytical quality indicators - where to now?. *Clin Chem Lab Med* 2018;57:127-33.
19. Wilson ML, Fleming KA, Kuti MA, et al. Access to pathology and laboratory medicine services: a crucial gap. *Lancet* 2018;391(10133):1927-38.
20. Emerson CI, Singer PA, Upshur RE. Access and use of human tissues from the developing world: ethical challenges and a way forward using a tissue trust. *BMC Med Ethics* 2011;12:2.
21. Sancesario G, Pezzati P. Ricerca sul materiale biologico: ritorno al futuro. *Biochim Clin* 2021;45:299-304.
22. Banfi G. Utilizzo del materiale biologico residuo nel laboratorio clinico. *Biochim Clin* 2021;45:408-11.
23. Recommendation CM/Rec (2016)6 of the Committee of Ministers to members states on research on biological materials of human origin. https://search.coe.int/cm/Pages/result_details.aspx?ObjectId=090000168064e8f. (last accessed: January 2022).
24. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: more than clinical chemistry? *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1579-86.
25. Joseph L. Your doctor, the pathologist, will see you now. *Am J Clin Pathol* 2021;156:939-40.
26. Ali SF, Cloe A, Siaghani PJ, et al. Bone marrow collection. *Am J Clin Pathol* 2021. doi: 10.1093/ajcp/aqab165. Epub ahead of print.
27. Siddon AJ, Kroft SH. The lab as a driver of quality in the preanalytical realm. *Am J Clin Pathol* 2021. doi: 10.1093/ajcp/aqab180. Epub ahead of print.
28. Plebani M. L'etica in medicina di laboratorio nella terza era della medicina. *Biochim Clin* 2021;45:176-9.

Determinazione e utilizzo clinico di autoanticorpi e/o di profili autoanticorpali nelle malattie epatiche autoimmuni – aggiornamento 2021

Chiara Bonaguri¹, Alessandra Melegari², Annalisa Russo¹, Alessandra Picanza¹, Roberta Minerba¹, Elena De Santis², Tommaso Trenti³ – per il Gruppo di Studio SIBioC Autoimmunità

¹SSUO Diagnostica delle Malattie Autoimmuni - UOC Diagnostica Ematochimica; Azienda Ospedaliero Universitaria, Parma

²SSUO Diagnostica delle Patologie Autoimmuni - Dipartimento Integrato Aziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda USL di Modena, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

³Dipartimento Integrato Aziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda USL di Modena, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

ABSTRACT

Description and clinical use of autoantibody determination in autoimmune liver diseases – update 2021, on behalf of the Study Group “Autoimmune Diseases” of the Italian Society of Clinical Biochemistry.

The autoantibody assessment in the field of autoimmune liver disease is crucial both for diagnosis and prognosis. Although these autoantibodies are sometime present even in the normal healthy individuals, their presence is a prerequisite to diagnose autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cholangitis (PBC); some of these autoantibodies are included in the diagnostic scoring system for these diseases. The laboratory diagnostics of autoimmune liver diseases, traditionally carried out using indirect immunofluorescence testing (IFT) on rodent tissue slices, has achieved substantial improvements due to innovative analytical opportunities, such as ELISA-based diagnostic assay and Multiple Immunodot Liver profile test based on recombinant or purified antigens. The aim of this document is to highlight the crucial role of the new antigen specific tests for a better diagnostic strategy in the field of the three major autoimmune liver diseases AIH, PBC and Primary sclerosing cholangitis (PSC).

Parole chiave: epatite autoimmune, colangite biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva

INTRODUZIONE

La ricerca e determinazione di autoanticorpi nel siero è un parametro di fondamentale importanza per la diagnosi e il trattamento di pazienti affetti da malattie autoimmuni (1).

A tutt'oggi sempre più numerose sono le malattie per le quali si sia accertata o anche solamente ipotizzata una patogenesi legata ad anomalie del sistema immuno-competente e che risultano caratterizzate spesso dalla presenza in circolo di autoanticorpi, cioè di immunoglobuline dirette contro sostanze “self” rappresentate da costituenti dell'organismo stesso.

La disponibilità di accertamenti diagnostici sierologici

consistenti nella determinazione di un pannello di autoanticorpi sempre più specifici e sensibili ha permesso al laboratorio clinico di giocare un ruolo centrale e insostituibile nella diagnosi e prognosi delle malattie autoimmuni, in quanto la Medicina di Laboratorio è l'unica disciplina che considera l'autoimmunità nella sua interezza e globalità, mentre, nei diversi ambiti clinici, essa appare frammentata per organo o specialità (2,3,4).

Le malattie epatiche autoimmuni, ben rappresentano la ineludibile complessità diagnostica e le nuove promettenti prospettive che, nell'ambito della Medicina di Laboratorio, interessano la disciplina dell'autoimmunità. In altri termini questo ambito diagnostico è emblematico

Corrispondenza a: Alessandra Melegari, SSUO Diagnostica delle Patologie Autoimmuni – Dipartimento Integrato Aziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda USL di Modena Nuovo Ospedale S. Agostino Estense, E-mail a.melegari@ausl.mo.it

Ricevuto: 27.09.2021

Revisionato: 13.10.2021

Accettato: 10.11.2021

Pubblicato on-line: 01.12.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.071

di quanta discussione, attività di comparazione, e di governo sia stata e sia ancora necessaria e di come il laboratorio ne costituisca lo specchio riflettente. Ne sono prova i moltissimi cambiamenti e l'affinamento nei recenti anni della propria capacità di diagnosi in stretta collaborazione con la ricerca scientifica e la innovazione tecnologica.

In questi anni, infatti, esami molecolari basati sull'utilizzo di antigeni purificati o ricombinanti e nuove strategie/soluzioni diagnostiche in parte automatizzate si sono affiancati alle tradizionali metodiche in immunofluorescenza e sono al momento oggetto di diversi protocolli di studio (5).

MALATTIE EPATICHE AUTOIMMUNI E PROFILI AUTOANTICORPALI CORRELATI

Le malattie autoimmuni del fegato sono un gruppo eterogeneo di patologie immunomediate caratterizzate da un'aggressione autoimmune nei confronti degli epatociti o dei colangiociti e si possono classificare in tre grandi entità: Epatite Autoimmune (EAI), Colangite Biliare Primitiva (CBP) e Colangite Sclerosante Primitiva (CSP). Queste patologie riconoscono al loro interno alcune varianti come le sindromi da sovrapposizione o "overlap" dove è presente in vario grado sia una componente colestatica che una componente infiammatoria. Fondamentale ai fini della diagnosi differenziale e delle conseguenti scelte terapeutiche è la distinzione fra danno epatocellulare e danno colestatico e la diagnostica anticorpale è, a questo livello, uno strumento essenziale per una corretta classificazione delle differenti entità nosologiche (5).

Benché la maggior parte di questi autoanticorpi non siano patologia-specifici, la loro determinazione è un prerequisito per la diagnosi di EAI e di CBP essendo parte integrante del sistema di score diagnostico delle medesime (5-8). Nella CSP, invece, gli autoanticorpi sono frequentemente presenti, ma rivestono un ruolo minore ai fini diagnostici.

Relativamente ai metodi di determinazione dei differenti autoanticorpi correlati alle epatopatie autoimmuni, in generale si può affermare che in Europa lo screening per questi marcatori viene tradizionalmente condotto utilizzando metodi in immunofluorescenza indiretta (IIF) su sezioni di tessuti murini e i titoli anticorpali sono inseriti negli score diagnostici. Invece, in altri Paesi (ad esempio negli Stati Uniti) i sistemi diagnostici in fase solida, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Immunoblotting prevalentemente, sono diffusamente utilizzati, anche se non è ancora chiaro come traslare i relativi risultati negli score diagnostici (5).

Epatite Autoimmune

L'EAI è un'infiammazione cronica del fegato ad eziologia sconosciuta, nella quale viene persa la tolleranza verso l'epatocita. I meccanismi alla base del danno epatico sono rappresentati da citotossicità cellulo-mediata e da citotossicità diretta (7).

La malattia colpisce soprattutto le donne, sia in età pediatrica che in età adulta, e si può associare ad altri quadri autoimmuni (colite ulcerosa, tiroiditi autoimmuni, colangite biliare primitiva e colangite sclerosante primitiva) (9).

La diagnosi di EAI è basata sul rilievo di elementi caratteristici che non sono, però, malattia-specifici e sull'esclusione di altre malattie epatiche, quali l'epatite virale. Il riscontro di autoanticorpi malattia-associati supporta la diagnosi di EAI (7,9,10).

Inoltre, si è soliti classificare le EAI in tipo 1 e tipo 2 sulla base del riscontro di specifici autoanticorpi (10).

Le EAI di tipo 1 esprimono tipicamente anticorpi anti-nucleo (ANA) e anti-muscolo liscio (ASMA). Circa il 50-75% di pazienti affetti da EAI sono ANA positivi e i pattern ANA più frequentemente osservati sono il pattern omogeneo e quello "speckled". Gli ASMA non sono patologia-specifici, in quanto possono essere osservati in differenti epatopatie non autoimmuni, e sono presenti in circa il 50% di pazienti con EAI di tipo I. A livello molecolare gli ASMA sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi che mostrano reattività per actina, tubulina e filamenti intermedi.

Le EAI di tipo 2 (circa il 5%-10% di tutte le EAI) si manifestano di preferenza in età giovanile/pediatrica e presentano abitualmente gli anticorpi anti-LKM1 (liver-kidney microsomal antibodies) e più raramente anticorpi anti-LKM3. L'autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti-LKM1 è il citocromo P450 (CYP). Gli anti-LKM3 non sono specifici per EAI e possono essere rilevati anche in pazienti affetti da epatite virale cronica C (HCV). È opportuno che la positività per anti-LKM1 sia sempre confermata da un esame in fase solida (ELISA o Immunoblotting).

Altri anticorpi riscontrati nelle EAI sono gli anticorpi anti-SLA (soluble liver antigens), anti-LP (liver-pancreas), anti-ASGPR (asiolo-glicoproteina) e anti-LC1 (citosol epatico di tipo 1) (7).

La positività per ANA, ASMA, LKM1 e SLA rientra nei criteri diagnostici delle EAI (7).

Colangite Biliare Primitiva

La CBP è un'epatopatia colestatica cronica, relativamente rara, ad evoluzione lenta e ad eziologia autoimmune caratterizzata da un'aggressione dei linfociti T nei confronti delle cellule dei dotti biliari intraepatici; il conseguente danneggiamento rende difficoltoso il drenaggio della bile dal fegato all'intestino, causandone, quindi, un ristagno nel fegato ed esitando in un tempo variabile in una insufficienza epatica (11).

I pazienti affetti da CBP sono principalmente femmine (90%), solitamente diagnosticate nella quinta o sesta decade di vita. È stato suggerito che la suscettibilità genetica costituisca un fattore di predisposizione alla CBP, mentre fattori ambientali quali infezioni, sostanze chimiche e fumo possono avere un ruolo causale.

Il decorso della malattia è variabile e una diagnosi accurata nei primi stadi è un elemento cruciale in quanto

un trattamento farmacologico precoce può rallentare l'evoluzione verso l'insufficienza epatica e migliorare la sopravvivenza (11,12).

La diagnosi si basa sulla combinazione di caratteristiche cliniche/istologiche, anomalie del profilo biochimico epatico in un quadro di colestasi persistente per più di sei mesi e presenza nel siero di anticorpi anti-mitocondrio (AMA) e/o di specifici ANA (8,13,14).

Gli AMA vengono rilevati circa nel 90% dei pazienti affetti da CBP e la elevata sensibilità e specificità che li caratterizza fa sì che la loro presenza rappresenti uno dei tre criteri diagnostici della CBP. Gli AMA, in realtà, sono un gruppo eterogeneo di anticorpi e sono diretti con diverse percentuali di frequenza contro diversi autoantigeni che fanno parte del complesso strutturale dell'enzima 2-ossiacido deidrogenasi, precisamente le sub unità E2 dell'enzima piruvato deidrogenasi (PDC-E2 - frequenza 90%), del complesso ossiglutarico deidrogenasi (OGDC-E2 - frequenza 50%) e del "branched-chain" chetoacido deidrogenasi (BCOAD-E2 - frequenza 50%) (15).

Gli AMA possono essere riscontrati nel siero di pazienti asintomatici con normale assetto enzimatico epatico; studi di monitoraggio hanno dimostrato che nel tempo la maggior parte di questi soggetti sviluppa CBP.

Per molto tempo l'esame in IIF su sezioni criostatate di fegato, rene e stomaco di ratto è stato considerato il gold standard per lo screening routinario degli AMA. Negli ultimi anni, da un lato le limitazioni presentate da questo esame (complesso come esecuzione, difficilmente standardizzabile, non completamente automatizzabile, operatore-dipendente nella interpretazione), dall'altro l'identificazione dei target molecolari degli AMA hanno portato allo sviluppo, alla validazione e alla introduzione nella diagnostica di laboratorio di esami molecolari antigeni-specifici che utilizzano la tecnica degli immunodosaggi ELISA o degli Immunoblotting (16,17).

I promettenti risultati ottenuti con test ELISA di ultima generazione che utilizzano l'antigene MIT3 (PDC-E2, OGDC-E2 e BCOAD-E2), capaci di rilevare positività in circa la metà dei pazienti AMA IIF negativi, suggeriscono di usare, al posto o in affiancamento dell'IIF, questi esami per la ricerca degli AMA, in particolare quando il laboratorio di area non abbia familiarità con l'uso e l'interpretazione in IIF (18).

Anche le determinazioni in Immunoblotting rappresentano una interessante alternativa diagnostica al test AMA in IIF in quanto questo test multiplex consente il simultaneo rilievo di differenti autoanticorpi specifici per la CBP utilizzando antigeni ricombinanti (16).

In aggiunta agli AMA, anche gli ANA, solitamente associati a malattie reumatiche autoimmuni, sono di frequente riscontrati nei pazienti affetti da CBP. Al momento, il metodo ritenuto il gold standard per la determinazione degli ANA è la IIF utilizzando come substrato le Human Epithelial Cells-2 (HEp-2) (19).

ANA specifici per la CBP sono stati rilevati da vari

Autori nel 30%-50% dei pazienti; sono stati descritti per questi autoanticorpi due diversi pattern di fluorescenza: rime-like/membranous (specificità per le proteine gp210 e Nucleoporina p62) e Multiple Nuclear Dots (specificità per le proteine sp100, promyelocytic leukaemia (PML) e small ubiquitin-like modifier) (19). Il riscontro di questi anticorpi, caratterizzati per altro da una bassa sensibilità, consente di confermare la diagnosi di CBP nei pazienti AMA negativi, frequentemente passibili di classificazione scorretta. Esistono, inoltre, alcune evidenze che la presenza di ANA CBP specifici, particolarmente anti-gp210, sia associata ad una peggior prognosi e ad una malattia più aggressiva (20,21). Infine, come per gli AMA, anche per gli ANA CBP specifici i nuovi test in fase solida (ELISA e Immunoblotting), specialmente quelli che utilizzano antigeni ricombinanti, quali il MIT3, appaiono più sensibili ed obiettivi della IIF.

A tale proposito, i risultati di un recente studio multicentrico condotto in Emilia-Romagna dal Gruppo di Studio SIBioC di Autoimmunità e che ha valutato, su 165 pazienti affetti da CBP, l'utilizzo combinato di nuovi test antigene-specifici e di test convenzionali in IIF (16,17), indicano come l'adozione di un profilo che comprenda sia i nuovi test in fase solida che i test in IIF possa effettivamente migliorare la sensibilità diagnostica per la CBP migliorando l'efficacia del percorso clinico, come recentemente riportato anche per le malattie reumatiche autoimmuni (22).

Altri ANA non specifici per la CBP, principalmente anticorpi anti-centromero e anti-SSA/Ro - 52 kDa, sono spesso rilevati (10%-30%) nei pazienti affetti da CBP, conferendo, secondo alcuni Autori, caratteristiche prognostiche sfavorevoli al decorso della malattia, quali un'accresciuta ipertensione portale. Questo dato correla con l'osservazione della associazione della CBP con altre malattie autoimmuni, come la sclerodermia, la sindrome di Sjogren e la Sindrome di CREST (calcinosis, Raynaud phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia) (19).

Infine, è interessante segnalare nuovi marcatori al momento allo studio per la diagnostica di laboratorio della CBP, precisamente due nuovi auto-antigeni (Kelch-like 12 e Hexokinase 1), marcatori genetici, particolari profili metabolici, micro RNA e fattori epigenetici (23).

Relativamente alla CBP, ci sembra di interesse notare come la accresciuta conoscenza delle associazioni sierologiche della malattia, unitamente al diffuso utilizzo di esami non invasivi come quelli di laboratorio, abbia significativamente modificato negli ultimi anni le potenzialità diagnostiche, consentendo di giungere spesso ad una diagnosi precoce rispetto al rilievo di una malattia epatica avanzata.

Colangite Sclerosante Primitiva

La CSP è una sindrome colestatica cronica caratterizzata da una fibrosi infiammatoria dei dotti biliari intra ed extra epatici.

La CSP interessa in genere maschi di giovane età ed è comunemente associata alle malattie infiammatorie

dell'intestino, specialmente la colite ulcerosa (CU).

Dal punto di vista della diagnostica di laboratorio, la maggior parte dei pazienti presenta un'elevazione della fosfatasi alcalina sierica e della γ GT che può essere accompagnata da un modesto aumento delle transaminasi; diversamente dalla CBP, nella CSP la ricerca degli anticorpi anti-mitocondrio è negativa. Utile alla diagnosi si è rilevata la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) con un quadro pANCA in etanolo, marcatore autoanticorpale presente anche in una percentuale elevata di pazienti affetti da CU (circa 80%). Per la loro scarsa specificità, il rilievo di p-ANCA può supportare la diagnosi di CSP solo in pazienti selezionati (24).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

In sintesi, la diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni epatiche, sia in termini di diagnosi differenziale che di diagnosi precoce, ha registrato negli ultimi anni importanti progressi e, senza dubbio, la prospettiva è aperta verso nuovi sviluppi. In questo ambito, una tematica che potrebbe essere di grande interesse nel prossimo futuro è il miglioramento nella standardizzazione dei metodi e la definizione di nuovi algoritmi diagnostici (23).

Al momento, il rilievo di specifici profili autoanticorpali è essenziale, tra le epatopatie autoimmuni, per la diagnosi di EAI e di CBP, mentre la diagnosi di CSP si basa essenzialmente sul quadro fornito dalla colangiopancreatografia retrograda endoscopica (5,6). Il valore cruciale degli autoanticorpi per la diagnostica differenziale di EAI e di CBP si esplica nelle conseguenti scelte terapeutiche.

Tuttavia, va comunque considerato che il mancato rilievo di autoanticorpi non esclude la presenza di una epatopatia autoimmune, per esempio una CBP AMA negativa.

In questo ambito diagnostico, in prospettiva la percentuale di pazienti negativi per gli AMA, che

rappresentano ancora il marcatore immunologico chiave per CBP, verrà significativamente ridotta dall'uso di nuovi esami di laboratorio antigenici specifici (esami in ELISA e in Immunoblotting) basati sull'utilizzo di antigeni ricombinanti (16,17).

Inoltre, la maggior diffusione di sistemi diagnostici automatizzati comprendenti un pannello completo degli auto-antigeni CBP correlati, inclusi i target antigenici nucleari gp210 e sp100, contribuirà alla ottimizzazione di nuovi algoritmi diagnostici.

La realizzazione di ulteriori studi multicentrici che valutino pazienti affetti da CBP di nuova diagnosi potrà effettivamente consentire di valutare questi nuovi strumenti analitici nella diagnostica di screening e differenziale della CBP. I risultati di questi studi potranno contribuire a ridisegnare l'intero processo diagnostico partendo dalla formulazione di un ragionevole sospetto clinico al momento della richiesta degli esami di laboratorio, con la possibilità di ricercare gli autoanticorpi più appropriati e assicurando, attraverso l'implementazione condivisa di algoritmi comuni, un'armonizzazione fra i diversi laboratori.

La scelta del miglior esame o profilo di esami da utilizzare dipende, a nostro avviso, da molti fattori che includono: la competenza dei professionisti, le tecnologie disponibili in laboratorio, la prevalenza nell'area esaminata di autoanticorpi associati alla epatopatia autoimmune e la disponibilità economica (16,22).

In questo nuovo scenario, come per altre patologie autoimmuni, il governo clinico e la standardizzazione dei metodi, risulteranno per le malattie epatiche autoimmuni due elementi imprescindibili per valorizzare le potenzialità dei marcatori autoanticorpali sia in ambito diagnostico che prognostico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

Tabella Sinottica delle principali indicazioni

	Epatopatie autoimmuni e autoanticorpi correlati									
	ASMA	Anti-LKM1	Anti-LKM3	Anti-SLA	Anti-LC1	AMA	ANA	Anti-sp100	Anti-gp210	P-ANCA
EAI Tipo 1	● ●			●						
EAI Tipo 2		● ●	●	●	●					
CBP						● ●	●	●	●	
CSP										●

EAI Tipo 1, Epatite Autoimmune Tipo 1; EAI Tipo 2, Epatite Autoimmune Tipo 2; CBP, Colangite Biliare Primitiva; CSP, Colangite Sclerosante Primitiva; ASMA, anti-muscolo liscio; Anti-LKM1, liver-kidney microsomal antibodies; Anti-LKM3, liver-kidney microsomal antibodies; Anti-SLA, soluble liver antigens; Anti-LC1, citosol epatico di tipo 1; AMA, anticorpi anti-mitocondrio; ANA, anticorpi anti-nucleo; anti-sp-100, anticorpi anti proteina granulare nucleare (specificità per sp100); anti gp210, anticorpi anti glicoproteina della membrana nucleare (specificità per 210) P-ANCA, anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili;

- ● Riscontro frequente ($\geq 50\%$ dei casi)
- Riscontro meno frequente ($< 50\%$ dei casi)

BIBLIOGRAFIA

1. Bonaguri C, Melegari A, Ballabio A, et al. Italian multicentre study for application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing for autoimmune rheumatic disease: conclusive results. *Autoimmun Rev* 2011;11:1-5.
2. Melegari A, Bonaguri C, Russo A, et al. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimm Rev* 2012;11:713-6.
3. Tozzoli R, Bonaguri C, Melegari A, et al. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:129-38.
4. Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Autoimmune diagnostics: the technology, the strategy and the clinical governance. *Immunol Res* 2015;61:126-34.
5. Sebode M, Weiler-Normann C, Liwinski T, et al. Autoantibodies in autoimmune liver disease – Clinical and diagnostic relevance. *Front Immunol* 2018;9:609.
6. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. The clinical usage and definition of autoantibodies in immune-mediated liver disease: a comprehensive overview. *J Autoimmun* 2018;95:144-58.
7. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2015;63:971-1004.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 2017;67:145-72.
9. Strassburg LP. Autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;5:667-82.
10. Manns MP, Lohse AW, Vergani D, et al. Autoimmune hepatitis – update 2015. *J Hepatol* 2015; Suppl 1:100-11. 62.
11. Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:291-308.
12. Floreani A, Caroli D, Variola A, et al. A 35 year follow-up of a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis seen at a single centre. *Liver Int* 2011;31:361-8.
13. Hirschfield GM, Dyson JK, Alexander GJM, et al. The British Society of Gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines. *Gut* 2018;67:65-74.
14. Tanaka A, Leung PSC, Gershwin ME. Evolution of our understanding of PBC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2018;34-35:3-9.
15. Gershwin ME, Makay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1987;138:3525-31.
16. Villalta D, Sorrentino C, Girolami E, et al. Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplex line-blot assay. *Clin Chim Acta* 2015;438:135-8.
17. Gatselis NK, Dalekos GN. Molecular diagnostic testing for primary biliary cholangitis. *Expert Rev Mol Diagn* 2016;9:1001-10.
18. Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, et al. Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 2007;27:378-87.
19. Granito A, Muratori P, Quarneti C, et al. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12:65-74.
20. Nakamura M, Komori A, Ito M, et al. Predictive role of anti-gp210 and anticentromere antibodies in long-term outcome in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2007;37:5412-9.
21. Huang C, Han W, Wang C, et al. Early prognostic utility of gp210 antibody-positive rate in primary biliary cholangitis: a meta-analysis. *Dis Markers* 2019; 2019:9121207.
22. Bonaguri C, Melegari A, Picanza A, et al. Association of solid-phase assays to the indirect immunofluorescence in primary biliary cholangitis diagnosis: Results of an Italian multicenter study. *Autoimm Rev* 2019;18:102389.
23. Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, et al. Primary biliary cholangitis: 2018 practice guidance from the American Association for the study of liver disease. *Hepatology* 2019;114:48-63.
24. Chapman MH, Thorburn D, Hirschfield GM, et al. British Society of Gastroenterology and UK-PSC guidelines for the diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2019;68:1356-78.

Longitudinal monitoring of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies after BNT162b2 vaccination in healthcare workers

Gian Luca Salvagno^{1,2}, Brandon M. Henry^{3,4}, Laura Pighi^{1,2}, Simone De Nitto^{1,2}, Gianluca Gianfilippi⁵, Giuseppe Lippi¹

¹Section of Clinical Biochemistry, University of Verona, Verona, Italy

²Service of Laboratory Medicine, Pederzoli Hospital, Peschiera del Garda, Italy

³Clinical Laboratory, Division of Nephrology and Hypertension, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA

⁴Disease Intervention & Prevention and Population Health Programs, Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, Texas, USA

⁵Medical Direction, Pederzoli Hospital, Peschiera del Garda, Italy

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, vaccination, antibodies, immune response

To the Editor,

Nearly two years after the origin of the ongoing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic, the race to develop and distribute effective coronavirus diseases 2019 (COVID-19) vaccines continues. Recent evidence suggests that the clinical efficacy of the COVID-19 vaccines currently cleared by EMA (European Medicines Agency) is as high as 80-100% shortly after administration (1), though a significant decline of efficacy after several months, especially in preventing symptomatic COVID-19 illness, has been recently demonstrated (2). This evidence leads the way to using additional vaccine boosters, usually to be administered 6 months after completing a standard vaccination cycle (3), and is supported by reliable laboratory data, demonstrating that vaccine efficacy depends on anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels (1), whose values tend to naturally wane over time (4,5). This study was hence aimed to provide further insights on the kinetics of anti-SARS-CoV-2 IgG neutralizing antibodies elicited by COVID-19 vaccination in healthcare workers and their potential correlation with vaccine efficacy.

We initially enrolled 100 healthcare workers of the Hospital of Peschiera del Garda (Italy), all SARS-CoV-2 seronegative, who voluntarily received COVID-19 vaccination with Pfizer/BioNTech BNT162b2 (Comirnaty, Pfizer Inc., New York, NY, US; 30 µg in two doses, 3 weeks apart). Serum samples were collected before all subjects received the first and second BNT162b2 vaccination, and then 1, 3 and 6 months after the second BNT162b2 dose. Serum values of anti-SARS-CoV-2 RBD (receptor binding domain) IgG antibodies were measured with ACCESS SARS-CoV-2 IgG II (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, US). This method is a paramagnetic particle, chemiluminescent immunoassay, excellently correlated with a surrogate virus neutralization test ($r=0.96$; $p < 0.001$), and with sensitivity and specificity for detecting previous SARS-CoV-2 infections, both approaching 100% (6). Results of measurements were reported in terms of antibodies units (AU)/mL (this method is not traceable to the World Health Organization standard), expressed as median and interquartile range (IQR). Effectiveness of BNT162b2 vaccination in eliciting a significant and durable humoral response in our population was defined as an anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies level ≥ 10 AU/mL, in keeping with manufacturer's recommendations. Further technical and analytical characteristics of this assay are reported elsewhere (7). All our study subjects provided a written informed consent for undergoing BNT162b2 vaccination and long-term serological monitoring. The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee of the Provinces of Verona and Rovigo (59 COVIDCESC; November 3, 2021).

The final study population included 86 SARS-CoV-2 baseline seronegative subjects, with a median age of 45 years (IQR 31-53 years; 47.7% males), while 14 subjects were lost to follow-up over the 6-month study period.

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Section of Clinical Biochemistry, University Hospital of Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10 37134 Verona - Italy, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 12.11.2021

Revisionato: 15.11.2021

Accettato: 16.11.2021

Publicato on-line: 24.11.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.074

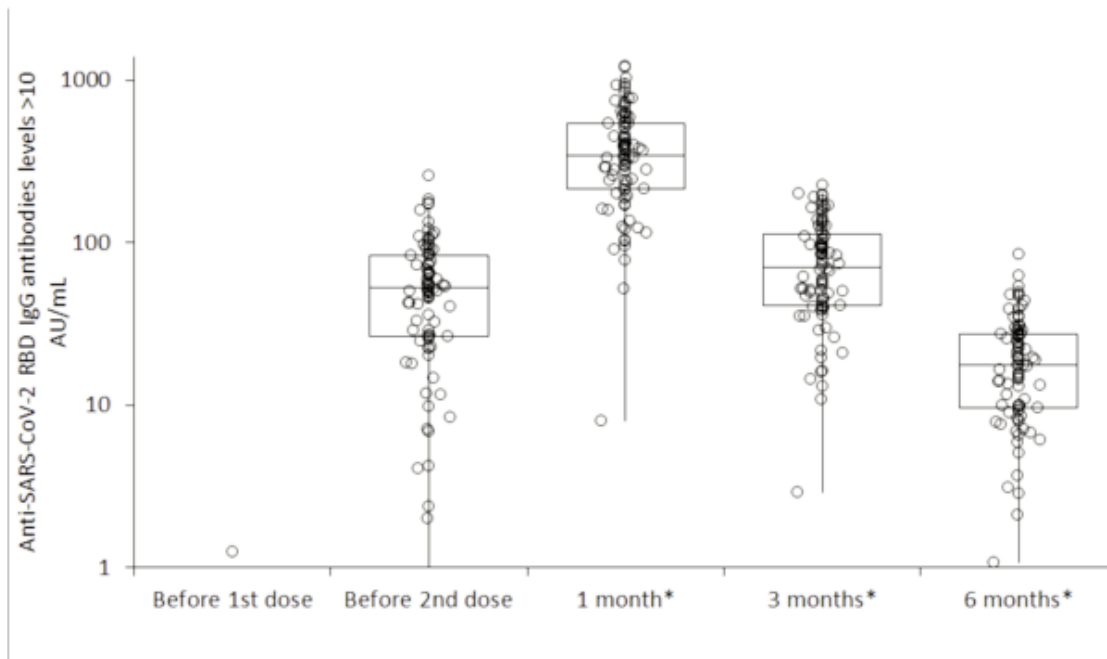


Figure 1
 Longitudinal monitoring of anti-SARS-CoV-2 RBD (receptor binding domain) IgG serum levels in seronegative healthcare workers undergoing BNT162b2 mRNA-based vaccine administration. The dashed line delineates the manufacturer's recommended threshold of antibodies positivity (i.e., ≥ 10 AU/mL).

*After the second vaccine dose

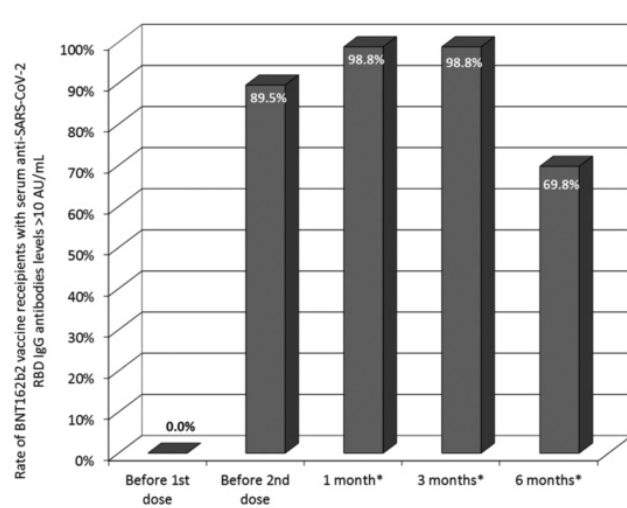


Figure 2
 Rate of BNT162b2 vaccine recipients displaying with anti-SARS-CoV-2 RBD (receptor binding domain) IgG serum levels ≥ 10 AU/mL, which corresponds to the antibodies positivity threshold defined by the manufacturer.

*After the second vaccine dose

The results of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies up to 6 months after completing the 2nd BNT162b2 vaccine dose is reported in Figure 1, showing that the serum levels of these antibodies reached a peak of 344.4 AU/mL (IQR, 216.7-542.2 AU/mL) 1 months after the second vaccine dose, but then declined to 70.6 AU/mL (IQR, 41.8-112.0 AU/mL) and further to 17.6 AU/mL (IQR, 9.7-27.3 AU/mL) at 3 and 6 months after the second vaccine dose, respectively. Such reductions correspond to a median decrease from the peak of -79.3% (IQR, -76.5 – -82.6%) and

-95.3% (IQR, -93.3 – -96.4%) at 3 and 6 months after the second vaccine dose, respectively. The overall rate of BNT162b2 vaccine recipients displaying serum anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies levels above the 10 AU/mL threshold is shown in Figure 2. Briefly, the rate increased from 0/86 (0%) at baseline (all subjects were SARS-CoV-2 seronegative), to 77/86 (89.5%) and 85/86 (98.8%) after the first and second BNT162b2 vaccine doses, remained stable up to 3 months after the second vaccine dose (85/86; 98.8%), but then declined to 60/86 (69.8%) when anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies were assayed 6 months after the second vaccine dose. Notably, it is not surprising that the only subject who remained seronegative (i.e., anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies levels <10 AU/mL) throughout the study period was a 70-year old man, since vaccine reactogenicity is reportedly lower in older male people (8,9).

In keeping with previous evidence from other countries, populations and settings (4,5), the results of this study on Italian healthcare workers who underwent administration of BNT162b2 mRNA-based COVID-19 vaccine suggest that humoral immunity and, more specifically, the serum levels of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies, displayed a dramatic decay 6 months after vaccination, with values 95,3% lower than those measured at the peak, with nearly 30% of subjects displaying antibodies levels below the recommended threshold of positivity (i.e., <10 AU/mL). This data suggests that nearly one-third of BNT162b2 vaccine recipients have an insufficient value of serum anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies at 6 months post-vaccination. Intuitively, this finding goes hand in hand with the evidence that the rate of breakthrough SARS-CoV-2 infections in COVID-19 vaccine recipients increases over time and is strongly correlated with the level of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies (10), as well as provides additional support to the importance of SARS-CoV-2 serologic monitoring before administration of vaccine boosters. This strategy would allow to timely identify those in whom the neutralizing antibodies have waned faster, have become more vulnerable to infection and disease, and shall hence be prioritized for receiving additional vaccine boosters in the future (8,9).

Acknowledgments

The authors are thankful to the entire staff of the Pederzoli Hospital of Peschiera del Garda (Verona, Italy) for accepting to participate to this study.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27:1205-11.
2. Chemaiteilly H, Tang P, Hasan MR, et al. Waning of BNT162b2 Vaccine Protection against SARS-CoV-2 Infection in Qatar. *N Engl J Med* 2021 NEJMoa2114114 doi: 10.1056/NEJMoa2114114.
3. Sarpatwari A, Pandya A, Hyle EP, et al. COVID-19 Vaccine boosters for all adults: an optimal U.S. approach? *Ann Intern Med* 2021 doi: 10.7326/M21-3927.
4. Bayart JL, Douxfils J, Gillot C, et al. Waning of IgG, total and neutralizing antibodies 6 months post-vaccination with BNT162b2 in healthcare workers. *Vaccines (Basel)* 2021;9:1092.
5. Naaber P, Tserel L, Kangro K, et al. Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study. *Lancet Reg Health Eur* 2021;10:100208.
6. Kitagawa Y, Imai K, Matsuoka M, et al. Evaluation of the correlation between the access SARS-CoV-2 IgM and IgG II antibody tests with the SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. *J Med Virol* 2021 doi: 10.1002/jmv.27338.
7. Ruscio M, D'Agnolo E, Belgrano A, et al. Analytical assessment of Beckman Coulter Access anti-SARS-CoV-2 IgG immunoassay. *J Lab Precis Med* 2021;6:3.
8. Lippi G, Henry BM, Plebani M. Optimizing effectiveness of COVID-19 vaccination: will laboratory stewardship play a role? *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1885-8.
9. Plebani M, Banfi G, Lippi G. Valutazione della risposta anticorpale post-vaccino COVID-19: fiat lux. *Biochim Clin* 2021;45:228-9.
10. Blain H, Tuailon E, Gamon L, et al. Receptor binding domain-IgG levels correlate with protection in residents facing SARS-CoV-2 B.1.1.7 outbreaks. *Allergy* 2021 doi: 10.1111/all.15142.

Labtestonline nel 2021

Francesca Biancalani, Margherita Berardi, Gianni Messeri

Gruppo LTO di SIBioC

Labtestonline.it (LTO), il sito di SIBioC dedicato all'informazione del cittadino sulle analisi di laboratorio include a oggi 382 esami.

Nonostante l'obiettivo prioritario di LTO sia sempre stato il cittadino e il linguaggio utilizzato negli articoli sia semplice e di facile comprensione, ci siamo resi conto nel tempo che la platea degli utenti è molto più variegata. Da un'indagine condotta nel corso di un mese, il 52% dei visitatori è risultato costituito da pazienti o soggetti a loro vicini, il 35% da professionisti sanitari di varia provenienza, il 10% da studenti. Nell'ambito dei sanitari il 36% era costituito da clinici, il 31% da specialisti di laboratorio e il 12% da infermieri.

Nel corso del 2021 sono stati introdotti 27 nuovi esami e ne sono stati aggiornati 69. Il 18% degli articoli ha subito l'aggiornamento nell'ultimo anno, il 20% negli ultimi due ed il 16% negli ultimi tre. L'interesse degli utenti è testimoniato dal numero di accessi che nel 2021 sono stati quasi 7 milioni con un incremento del 19,5 % rispetto al 2020. Per quanto riguarda gli esami che hanno avuto il maggior numero di visite, nel 2021 le prime cinque posizioni sono state occupate, nell'ordine, da Immunoglobuline, Anticorpi anti-nucleo, D-dimero, Anticorpi anti Epstein-Barr virus e Proteina C reattiva. Il tempo medio di permanenza dei visitatori nelle pagine relative a questi esami è dell'ordine dei quattro minuti.

Come già annunciato in passato, gli articoli pubblicati, man mano che sono introdotti o aggiornati nel sito statunitense, vengono tradotti in italiano e sottoposti ad un'ulteriore revisione da parte del Comitato Editoriale SIBioC. Con il passare del tempo l'intervento dei revisori è diventato sempre più importante e non di rado costituisce una vera e propria riscrittura dell'articolo. Questo a riprova della competenza e professionalità dei componenti del Comitato e della sempre maggior autonomia nei confronti dei colleghi americani. Nel 2021 sono state eseguite 39 revisioni da parte di 19 membri del Comitato.

A testimonianza della qualità dell'informazione fornita, a LTO è stato rinnovato il certificato HON CODE per l'affidabilità dell'informazione medica. Il logo del certificato è riportato in calce alla home page di LTO e cliccando su tale logo è possibile verificare i requisiti richiesti per la certificazione. Nell'affollato panorama dell'informazione medica su Internet, non molti siti possono vantare questo tipo di attestazione di qualità.

Le News, presentate nella home-page del sito e finalizzate alla rapida ed agile comunicazione delle più importanti novità nell'ambito della Medicina di Laboratorio sono state 10. Tutte le News fino ad oggi pubblicate sono sempre accessibili dalla stessa pagina. L'importante attività sulle reti sociali (Facebook e Twitter) è proseguita con numerosi post.

È noto che la maggior parte degli accessi a LTO dipende dall'indicizzazione operata dai motori di ricerca, prevalentemente da Google. La posizione in cui, nel corso di una ricerca su Google, appare un sito (rank) è determinante ai fini del numero di accessi al sito stesso. È stato avviato quindi un monitoraggio trimestrale della posizione in cui le pagine di LTO vengono proposte quando ricercate tramite Google. Lo studio ha riguardato 15 esami fra i più comuni e 15 fra i più specialistici. I risultati relativi all'ultimo trimestre 2021 per i due gruppi sopra descritti sono riportati nella Figura 1. È evidente da questo studio come LTO sia spesso il sito maggiormente proposto in caso di esami specialistici. Nel caso invece di esami di uso molto comune, la "concorrenza" di altri siti è più evidente. Le mediane calcolate nei due gruppi testimoniano un miglioramento nel corso dell'ultimo trimestre.

Gli obiettivi principali per il 2022 sono l'aumento della frequenza degli aggiornamenti e dell'efficienza dell'opera di revisione, quest'ultima sempre più orientata all'adattamento dei testi alla situazione italiana. LTO deve divenire sempre di più lo strumento attraverso il quale il grande patrimonio culturale della SIBioC si esprime non solo nell'ambito dei cultori della Medicina di Laboratorio ma anche nella comunicazione continua verso il cittadino.

Corrispondenza a: Gianni Messeri, Gruppo LTO di SIBioC, E-mail messeri.gianni@gmail.com

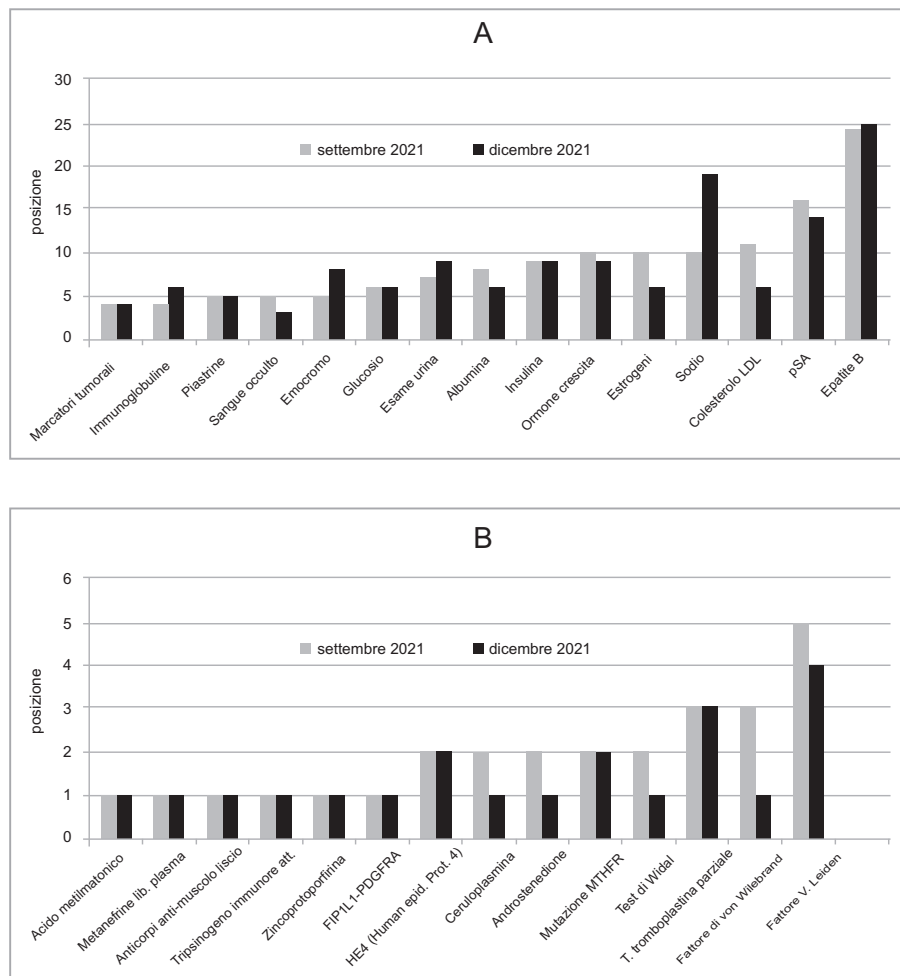


Figura 1
 Posizione di visualizzazione attribuita da Google per gli esami più comuni (pannello A) e specialistici (pannello B). A settembre la mediana delle posizioni (rank) è risultata 8 per il gruppo A e 2 per il B, a dicembre entrambe sono salite rispettivamente a 6 e 1.

Nell'Articolo "**Elementi utili per implementare un sistema per il controllo dell'accuratezza dei risultati nella diagnostica di SARS-COV-2 (RNA virale, antigeni e anticorpi)**" di Sonia Maria Mattioli, Massimo Quercioli, Sabrina Buoro, Patrizia Pecile, Maria Grazia Colao, Elena Pariani, Cosimo Ottomano, Duilio Brugnoli, pubblicato su *Biochimica Clinica* 2021;45:400-7, la Tabella 1 di pag 404 è stata inserita per errore e deve pertanto essere ignorata. Ci scusiamo con gli Autori e con i Lettori.



BIOMEDIA

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*.