
BC

biochimica clinica

In questo numero:

**VARIANTI INSTABILI DELL'EMOGLOBINA:
UNA SFIDA PER IL LABORATORIO?**

vedi pag. 92 e 96

DOCUMENTO SIBioC

**COME REFERTARE L'EMOGLOBINA GLICATA IN PRESENZA
DI VARIANTI EMOGLOBINICHE**

vedi pag. 176

*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

92

Guida completa allo studio delle emoglobinopatie
A. Mosca, M.S. Graziani

94

Diagnostica delle crioglobulinemie: l'alleanza laboratorio-clinica apre una nuova era per l'armonizzazione di un esame critico e complesso
M. Mussap, M. Zaninotto

RASSEGNE

96

Varianti instabili dell'emoglobina: una sfida per il Laboratorio?
G. Barberio, G. Ivaldi

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

117

Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-epoxide measurement with the reference LC-MS/MS method and a routine immunoassay
D. Negrini, W. Magon, D. Peserico, G. Lippi, E. Danese

122

Evaluation of a panel of polymorphisms in vitamin D-related genes, vitamin D status and Multiple Sclerosis
L. Agnello, C. Scazzone, B. Lo Sasso, R.V. Giglio, C.M. Gambino, M. Vidali, M. Ciaccio

126

Diagnostica molecolare per il SARS-CoV-2: un programma sperimentale per la Valutazione Esterna di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio
L. Galla, L. Sciacovelli, A. Padoan, M. Plebani

134

Modello organizzativo di gestione decentrata della terapia anticoagulante orale nella ULSS 6 Euganea
E. Gnatta, R. Ghirardo, V. Temporin, A.M. Leo

141

Effects of selected preanalytical variables on Dried Blood Spot (DBS) and Volumetric Adsorptive Microsampling (VAMS) based bioanalytical methods for the determination of four β -lactam antibiotics
F. Mensitieri, A. Coglianesse, V. Giudice, B. Charlier, F. De Rosa, A. Filippelli, F. Dal Piaz, V. Izzo

154

Applicazione dell'analisi dei Big Data nella valutazione dell'utilità clinica della determinazione degli anticorpi anti SARS-CoV-2 di tipo IgM: l'esperienza di Modena
V. Pecoraro, T. Pirotti, T. Trenti, M. Plebani

160

Extra-analytical Point of Care Testing errors in the pandemic era
P. Carraro, H. Afshar, S. Ferrarese, R. Dittadi

sommario

DOCUMENTI

166

Diagnosi di crioproteinemia: preziosa collaborazione tra laboratorio e clinica per la corretta gestione di una patologia rara
P. Natali, D. Debbia, J. Sheldon, A. Bari, U. Basile, F. Lavatelli, D. Patel, M. Galli, E. Villa, C. Salvarani, G. Palladini, M.T. Mascia, G. Sandri

DOCUMENTI SIBioC

176

How to report HbA_{1c} in presence of hemoglobin variants
M. Carta, R. Paleari, A. Terreni, A. Mosca, on behalf of the Intersociety Study Group (SIBioC-SIPMeL) on Diabetes

LETTERE ALL'EDITORE

180

Glycated albumin stability in frozen plasma samples
R. Paleari, G. Santini, A. Mosca

CASI CLINICI

e4

Una anemia in gravidanza da indagare attentamente
G. Barberio, F. Bassetto, E. Cover, E. Gorrasi, F. Martignago, C. Mattiuzzo, A. Pegoraro, S. Zago

e8

Un utile riscontro occasionale di variante emoglobinica
M. Carta, G. Barberio, M.G. Meneghini, L. Forner, A. Rodolfi, G. Marzotto, L. Pressi, D. Giavarina

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 2 - Giugno 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.

Guida completa allo studio delle emoglobinopatie

Andrea Mosca¹, Maria Stella Graziani²

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

²Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona

I difetti dei geni globinici rappresentano una percentuale significativa delle malattie genetiche in tutto il mondo e decisamente sono i difetti genetici più frequenti nella popolazione italiana. La ricerca, la prevenzione, la diagnosi e il trattamento di queste condizioni hanno ricevuto grande attenzione negli ultimi settant'anni ed il laboratorio clinico spesso si trova a dovere affrontare la diagnostica di queste patologie.

In più occasioni gli aspetti diagnostico-analitici possono non essere di immediata soluzione, in considerazione del fatto che si osserva una notevole eterogeneità genotipica ed anche, di conseguenza, una grande variabilità fenotipica. Bisogna anche considerare che i recenti flussi migratori hanno reso la popolazione italiana più eterogenea rispetto agli anni '50, quando i primi due ricercatori che si occuparono in Italia di questi argomenti, i coniugi Silvestroni e Bianco, promossero la creazione dei "Centri della microcitemia", orientati principalmente allo studio ed alla prevenzione dell'anemia mediterranea. Ed, infine, bisogna anche tenere presente che, soprattutto in ambito pre-natale e neo-natale, le interazioni con altri professionisti di area clinica, richiedono grande attenzione e professionalità.

Biochimica Clinica è lieta di ospitare in questo numero una rassegna sulle emoglobine instabili (1) che segue a ruota altre tre precedenti eccellenti rassegne degli stessi Autori, rispettivamente sulla nosografia clinica e sulla epidemiologia delle emoglobinopatie (2), sulla diagnostica di laboratorio di primo e di secondo livello (3), e sui quadri clinici e le prospettive future di diagnosi e di terapia (4). Queste rassegne complessivamente coprono in modo esaustivo e con estrema competenza questo complesso campo della medicina di laboratorio.

In quest'ultima rassegna gli Autori descrivono con chiarezza le cause molecolari che determinano un'anemia emolitica, più o meno severa, nei portatori di emoglobine instabili e gli aspetti essenziali per una corretta diagnosi differenziale rispetto alle altre anemie emolitiche intra- ed extra- vascolari. Particolarmente interessanti i punti che riguardano la trasmissibilità ereditaria, nella maggior parte dei casi in modalità dominante, i fattori esogeni causativi dei fenomeni emolitici ed i percorsi di laboratorio, sottolineando quanto poco conosciuta e praticata sia questa diagnostica in Italia. La diagnostica di laboratorio è trattata in dettaglio e con estrema accuratezza: è suddivisa in tre livelli di specializzazione (di base, intermedio e specialistico) nella consapevolezza che non in ogni laboratorio è possibile eseguire diagnostiche specialistiche che richiedono competenze e dotazioni specifiche. Tuttavia, la conoscenza di tutti i diversi gradi della diagnostica è indispensabile per dar modo ad ogni professionista di laboratorio di orientarsi all'interno del problema specifico e di rivolgersi ai Centri specializzati, quando è opportuno.

I due autori sono ben noti ai lettori di Biochimica Clinica, sia per la loro competenza scientifica, che per la loro disponibilità a collaborare ed a portare alla diagnosi molecolare i casi più complicati e clinicamente rilevanti. Giovanni Ivaldi, in particolare, ha operato per anni presso l'unità di Genetica Medica degli Ospedali Galliera di Genova, è noto a livello internazionale per i suoi studi nel campo delle emoglobinopatie, ed ha contribuito alla scoperta di diverse varianti emoglobiniche ritrovate sul territorio nazionale per la prima volta e descritte poi in letteratura. Giuseppina Barberio è veramente appassionata a questo argomento, ed ha contribuito in maniera sostanziale allo studio delle casistiche, nonché alla diffusione della formazione professionale nell'ambito di vari convegni e corsi ECM e alla divulgazione della conoscenza.

Infine, va ricordato che nella terza rassegna (4) ha voluto portare un contributo anche Maria Domenica Cappellini (nota a tutti come Nica), che ha tenuto per anni il registro dei talassemici e dei soggetti con drepanocitosi nell'area milanese. Anche lei competentissima, molto disponibile e grande comunicatrice. Il coinvolgimento di professionisti provenienti da aree diverse della medicina nelle pubblicazioni della rivista (sempre più auspicabile) è un arricchimento culturale che va nella direzione sempre più attuale di una diagnostica integrata.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dip. Fisiopatologia MCT, Via Fratelli Cervi 93 20054 Segrate (IT), E-mail: andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 12.04.2022

Accettato: 13.04.2022

Pubblicato on-line: 27.05.22

DOI: 10.19186/BC_2022.024

Nel ringraziare di cuore gli autori per aver voluto portare a compimento questo complesso capitolo della Medicina di Laboratorio, auguriamo ai fedeli amici di Biochimica Clinica una piacevole lettura.

BIBLIOGRAFIA

1. Barberio G, Ivaldi G. Varianti instabili dell'emoglobina: una sfida per il Laboratorio. *Biochim Clin* 2022;46:96-116.
2. Barberio G, Ivaldi G. Le emoglobinopatie in Italia. Parte I: Nosografia clinica ed epidemiologia. *Biochim Clin* 2016;40:78-95.
3. Barberio G, Ivaldi G. Le emoglobinopatie in Italia. Parte II: Prevenzione e diagnostica di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:96-107.
4. Ivaldi G, Barberio G, Cappellini MD. Emoglobinopatie: quadri clinici e ruolo del laboratorio tra realtà e prospettive future. *Biochim Clin* 2021;45:123-40.

Diagnostica delle crioglobulinemie: l'alleanza laboratorio-clinica apre una nuova era per l'armonizzazione di un esame critico e complesso

Michele Mussap¹, Martina Zaninotto²

¹ Unità Molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi, Cagliari

² QI.LAB.MED, Spin-off dell'Università di Padova

La diagnostica di laboratorio delle crioglobuline è uno degli esami di più lunga tradizione del laboratorio clinico (1); ciononostante, rimane a tutt'oggi tra le più critiche e complesse determinazioni che il professionista di medicina di laboratorio deve affrontare nella pratica routinaria. In generale, le difficoltà associate alla determinazione delle crioglobuline sono sottovalutate per due ragioni: la bassa numerosità rispetto a moltissimi altri esami (enzimi, substrati, ormoni, marcatori) e l'impossibilità di inserire questa determinazione nel ciclo di automazione del laboratorio. D'altra parte, la diagnosi di crioglobulinemia si basa sull'esame di laboratorio e ciò conferisce al risultato un'importanza clinica strategica (2). La determinazione e tipizzazione delle crioglobuline è fondamentale nelle discrasie plasmacellulari e più in generale nei disordini immunoproliferativi e nelle patologie su base autoimmunitaria, nonché in tutte le patologie caratterizzate da specifiche manifestazioni cliniche, associate o meno ai virus dell'epatite C (HCV) e B (HBV), come le vasculiti (ad esempio, il fenomeno di Raynaud, le porpore), le artralgie e artriti, la sindrome di Sjögren, le neuropatie periferiche, le astenie, la positività al fattore reumatoide, il deficit di fattore 4 del complemento (3,4). Ne deriva che, come per tutti gli altri esami, l'appropriatezza della richiesta è il primo, fondamentale passo per ottenere l'informazione più efficace dal risultato (5).

Le problematiche più rilevanti si possono riassumere in 3 punti: estrema criticità della fase pre-pre-analitica e pre-analitica; elevata variabilità della fase analitica, dovuta alla manualità del processo; scarsa armonizzazione della fase post-analitica, dovuta alla mancanza di un referto che contenga tutte le informazioni essenziali per generare la decisione clinica. Nonostante esistano dettagliate raccomandazioni, anche recenti, sulla gestione di tutto il processo che riguarda la diagnostica di laboratorio delle crioglobulinemie (6,7), sono ancora molti i punti critici irrisolti che possono compromettere l'affidabilità dei risultati.

Per questi motivi, risulta di grande utilità e interesse il lavoro di Patrizia Natali e del gruppo di studio SIBioC sulle proteine, pubblicato su questo numero di *Biochimica Clinica*; il lavoro riassume i contenuti di un incontro congiunto sull'argomento tenutosi a Modena nel settembre 2021 e presenta una disanima dettagliata sugli aspetti analitici e clinici della determinazione delle crioglobuline (8). Agli Autori va dato poi il grande merito di aver promosso una stretta collaborazione tra SIBioC e Associazione Italiana Lotta contro le Crioglobulinemie (ALCRI), allo scopo di condividere e tracciare una linea comune di indirizzo utile sia ai laboratoristi che ai clinici. Il percorso appare lungo e complesso, ma stimolante, perché da questa collaborazione deve nascere un "sistema condiviso" sulla gestione del campione di sangue per ricerca e tipizzazione di crioglobuline e sulla gestione dell'informazione clinica che il laboratorio fornisce in base ai risultati.

Il lavoro di Patrizia Natali contiene dettagliate raccomandazioni su come ottenere e migliorare la qualità delle varie fasi del processo e rappresenta un chiaro esempio di come SIBioC, per mezzo dei suoi gruppi di studio e dei professionisti che li animano, sia un supporto fattivo per l'attività lavorativa dei soci. Al di là delle fondamentali indicazioni riportate nel lavoro, noi vogliamo sottolineare due aspetti preliminari altrettanto essenziali: la formazione del personale e l'acquisizione di idonei supporti tecnologici e informatici. Negli ospedali, la formazione del personale di reparto è un aspetto cruciale che deve essere gestito dal laboratorio clinico in collaborazione con la direzione delle professioni sanitarie, sia attraverso un'attività teorico-pratica focalizzata soprattutto sull'importanza strategica di mantenere a temperatura controllata tutta la fase pre-pre-preanalitica, che con idonei mezzi visivi (ad esempio, cartelli-poster da appendere in reparto, brevi filmati esplicativi di 1-2 minuti) che riassumano in poche immagini le fasi del processo di prelievo, conservazione e trasporto del campione. Il principale obiettivo è quello di promuovere la consapevolezza che il mancato rispetto delle corrette procedure a temperatura controllata, anche quelle che appaiono meno importanti (come la pre-termostatazione dei dispositivi di prelievo), si riflette significativamente sul risultato, con conseguenze negative per la gestione del paziente. Dal momento che non tutti i sistemi di posta pneumatica possono consentire il corretto trasporto dei campioni in contenitori isotermitici, occorre istruire il personale addetto al trasporto manuale, soprattutto nelle realtà dove non esiste la posta pneumatica e in quelle dove i reparti sono dislocati in

Corrispondenza: Michele Mussap, Laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi, Cittadella Universitaria S.S. 554, 09042 Monserrato, Cagliari, E-mail: michele.mussap@unica.it;

Ricevuto: 13.04.2022

Accettato: 14.04.2022

Publicato on-line: 27.05.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.025

padiglioni diversi da quello del laboratorio clinico. Analogamente, nei distretti socio-sanitari nei quali si effettua attività ambulatoriale di laboratorio, la formazione deve coinvolgere sia i prelevatori che i trasportatori, con le medesime modalità usate nell'ospedale. Un breve manuale di formazione condiviso e pubblicato da SIBioC-ALCRI può essere un ottimo strumento da presentare alle direzioni strategiche e sanitarie delle strutture ospedaliere e territoriali per poi promuoverne la diffusione.

Alla formazione occorre affiancare l'acquisizione sia di dispositivi che consentano di effettuare e mantenere il processo preanalitico a temperatura controllata (come i citati contenitori isotermici) che di supporti telematici in grado di fornire dati in tempo reale al laboratorio sulla tracciabilità degli orari di prelievo e spedizione del campione, sul monitoraggio della sua temperatura e della sua ubicazione fino all'arrivo in laboratorio. La realizzazione di questi due obiettivi mette in condizione il laboratorio di attuare il controllo del processo e quindi di valutare l'idoneità del campione pervenuto, evitando di esaminare campioni scorretti che possono dare origine a risultati falsi negativi o comunque scarsamente affidabili, come nel caso di formazione del coagulo non avvenuta a +37°C.

La fase pre-analitica in laboratorio deve essere standardizzata il più possibile; vanno accuratamente evitate "scorciatoie" pericolose, come ad esempio l'interruzione anche breve del mantenimento della temperatura del campione a +37°C fino al momento della separazione del siero dalla parte corpuscolata in apposite provette coniche graduate traslucide e nei tubi di Wintrobe. Inutile sottolineare che la temperatura di centrifugazione è importantissima, e che le condizioni di centrifugazione lo sono altrettanto, come pure la temperatura di conservazione del siero per 5-7 giorni che va attentamente controllata e monitorata.

Riguardo alla fase analitica, che prevede la valutazione del crioprecipitato, l'eventuale presenza di interferenti, come i lipidi, la quantificazione del crioprecipitato (criocrito) e, in caso di positività, la sua tipizzazione mediante immunofissazione, è importante concordare con tutto il personale coinvolto rigorose istruzioni operative per garantire la standardizzazione di tutte le fasi di lavoro, minimizzando la variabilità inter-operatore. In questo senso, il lavoro di Patrizia Natali, è un'ottima fonte di informazione per la stesura di istruzioni operative corrette. Inoltre, si richiama l'obbligo della partecipazione ai programmi di verifica esterna della qualità per le crioglobuline che, come descritto nel lavoro, sono disponibili sul mercato.

Infine, ancora una volta occorre concordare con i clinici il tipo di messaggio più efficace derivante dall'analisi dei risultati: il referto dovrebbe essere standardizzato in modo da ottenere finalmente l'armonizzazione della risposta tra i laboratori e rendere i risultati confrontabili per un monitoraggio ottimale del paziente e dell'efficacia terapeutica. Questo aspetto così rilevante può essere un altro spunto di stretta collaborazione SIBioC-ALCRI; per esempio, è auspicabile un documento congiunto di indirizzo sulla presentazione dei risultati, sui commenti interpretativi e su altri approfondimenti come ad esempio, quando e se riportare la descrizione dell'aspetto del crioprecipitato o come procedere in caso di crioprecipitati molto scarsi, cioè se vale la pena di quantificarli e tipizzarli in ogni caso o se per valori molto bassi concordare un commento interpretativo adeguato, come raccomandato in precedenza da SIBioC (5). Molto importante è anche il ragionamento che il professionista di laboratorio deve intraprendere per la corretta interpretazione dei risultati; uno degli aspetti più cruciali, infatti, è quello di valutarli nel contesto di altri esami specifici, come ad esempio il fattore reumatoide, il complemento, l'elettroforesi sieroproteica, e così via. Anche in questo caso, la diffusione di un documento condiviso SIBioC-ALCRI tra i clinici e nei laboratori contribuirebbe in modo rilevante all'armonizzazione del referto e al miglioramento del dialogo laboratorio-clinica.

Non meno importante appare la corretta informazione ai Medici di Medicina Generale, che, attraverso l'attività dei delegati regionali SIBioC e ALCRI potrebbe coinvolgere gli ordini provinciali, presentando un documento più articolato ed esteso preparato e condiviso dalle due società.

In definitiva, noi auspichiamo che il meritevole lavoro di Patrizia Natali sia solo il primo passo di un'attività formativa e operativa più ampia per fornire al professionista di laboratorio e al clinico gli strumenti indispensabili per risolvere le maggiori criticità e valorizzare i risultati delle diagnostiche biochimiche specialistiche, nell'interesse primario della cura del paziente. La sfida di applicare poi, nella pratica routinaria, quanto previsto nelle raccomandazioni non può prescindere dalla formazione continua del personale e dall'acquisizione di adeguate risorse; entrambe queste attività richiedono uno specifico impegno capillare ed una maturata credibilità di fronte ai colleghi clinici e alle direzioni aziendali da parte dei professionisti dell'area della medicina di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Wang AC, Wells JV, Fudenberg HH, et al. Chemical analyses of cryoglobulins. *Immunochemistry* 1974;11:341-45.
2. Motyckova G, Murali M. Laboratory testing for cryoglobulins. *Am J Hematol* 2011;86:500-2.
3. Roccatello D, Saadoun D, Ramos-Casals M, et al. Cryoglobulinaemia. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:11.
4. Voma CB, Levinson SS. Analysis, detection and quantitation of mixed cryoglobulins in HCV infection: brief review and case examples. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1853-59.
5. Natali P, Debbia D, Trenti T, et al. Frequency and results of Cryoglobulin retesting in 4,963 Patients: Comment on the article by Kolopp-Sarda et al. *Arthritis Rheumatol* 2020;72:1955-6.
6. Passerini G, Basile U. per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine. Ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline: indicazioni per un protocollo condiviso. *Biochim Clin* 2010;34:218-22.
7. Kolopp-Sarda MN, Miossec P. Practical details for the detection and interpretation of Cryoglobulins. *Clin Chem* 2022;68:282-90.
8. Natali P, Debbia D, Sheldon J, , et al. Diagnosi di crioproteinemia: preziosa collaborazione tra laboratorio e clinica per la corretta gestione di una patologia rara. *Biochim Clin* 2022.

Varianti instabili dell'emoglobina: una sfida per il Laboratorio?

Giuseppina Barberio¹, Giovanni Ivaldi²

¹UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviso, ULSS2 Marca trevigiana, Treviso

²Già Laboratorio di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova

ABSTRACT

Unstable hemoglobin variants: a challenge for the laboratory?

The unstable variants represent a subset of rare or very rare defects in the heterogeneous area of hemoglobinopathies; however they constitute a very important group of variants for the related clinical aspects. They exhibit a variety of manifestations that are characterized in many cases by more or less important hemolytic anemias able to attract the attention of clinicians. Actually, the signs produced by the reduced survival of erythrocytes in an adult or often in a child, can have different origins, being the consequence of an alteration of the structure of the erythrocyte membrane, produced by enzymatic or other defects. More than 150 hemoglobin variants, because of their *in vitro* and/or *in vivo* behavior, are generically classified as unstable and can potentially produce hemolytic anemia in various conditions and forms. Generally, a single amino acid substitution can produce an alteration in the primary structure of hemoglobin that promotes the formation of insoluble precipitates within the red blood cells and thus a hemolytic effect. For these particular diseases, the role of the laboratory is essential to differentiate and characterize the causes of the hemolytic anemias. The laboratory contributes to the diagnosis at different levels utilizing continuously evolving methodologies, while maintaining, when necessary, traditional approaches, still essential in solving a number of diagnostic challenges.

Parole chiave: Hb instabili, anemia emolitica, talassemie

INTRODUZIONE

Le varianti instabili rappresentano un gruppo di difetti rari compresi nell'insieme eterogeneo delle emoglobinopatie e ne costituiscono un sottoinsieme importante per gli aspetti clinici che le caratterizzano. Si manifestano con una varietà di fenotipi prodotti dalla ridotta sopravvivenza eritrocitaria e si inseriscono nell'ampio capitolo delle anemie emolitiche. In realtà, le anemie emolitiche, nei soggetti adulti e nei bambini, possono essere prodotte da cause diverse intra- o extra-globulari. Tra le cause intra-globulari di origine genetica ricordiamo i difetti di struttura della membrana eritrocitaria, i difetti enzimatici eritrocitari ed alcune particolari variazioni dell'emoglobina (Hb) (1-3). In pazienti nei quali si sospetta una anemia emolitica raramente la prima causa ipotizzata è quella di un difetto Hb (4) ma, tra le oltre 1 400 varianti Hb fino ad oggi caratterizzate, oltre 150, per il loro

comportamento *in vitro* e/o *in vivo*, vengono classificate genericamente instabili (5,6) e sono, pertanto, potenzialmente all'origine di anemie emolitiche. Alcune di queste varianti instabili si manifestano con una evidente anemia emolitica cronica, mentre in altri casi i segni di emolisi compaiono solo occasionalmente. In genere, a produrre anomalie nella struttura primaria dell'Hb è una singola sostituzione amminoacidica che favorisce la formazione di precipitati insolubili all'interno del globulo rosso, fenomeno che rappresenta la prima causa dell'anemia emolitica. Per capire come la sostituzione o la delezione di un singolo amminoacido possano compromettere un'intera molecola e come poter interpretare o prevedere i variegati effetti di sostituzioni diverse in siti diversi, è necessario osservare nei dettagli la struttura della molecola Hb. Tale struttura ci è stata rivelata dagli studi teorici a partire dagli anni '60 e dalle informazioni che continuiamo ad acquisire con la caratterizzazione di

Corrispondenza a: Giovanni Ivaldi, Via Dell'Alloro 36/13, 16153 Genova, E-mail g.ivaldi@live.it

Ricevuto: 19.11.2021

Revisionato: 15.12.2021

Accettato: 28.12.2021

Pubblicato on-line: 26.01.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.001

nuovi difetti strutturali. Pertanto è opportuno che l'osservazione di una variante Hb, nel corso di esami di 1° livello, sia sempre seguita dalla definizione molecolare del difetto globinico. Riteniamo utile qui richiamare sinteticamente l'attenzione su vecchi concetti basilari che possono aiutare a comprendere e a prevedere meglio i diversi comportamenti *in vivo* e *in vitro* delle varianti Hb, in particolare di quelle instabili.

In Italia sono state osservate diverse varianti α e β instabili, alcune sono riportate nella Figura 1 e tra queste, alcune sono state riscontrate per la prima volta in singoli soggetti o in famiglie di origine italiana (7-9). Per queste particolari patologie, il laboratorio può operare a diversi livelli e con metodologie in continua evoluzione, mantenendo tuttavia, quando necessario, anche approcci tradizionali senza i quali alcuni casi potrebbero apparire vere e proprie sfide diagnostiche.

Emoglobina: interazioni e alterazioni

La struttura della molecola emoglobinica

Ogni molecola di emoglobina è formata da quattro catene polipeptidiche, a due a due uguali fra loro e da quattro gruppi emici legati a ciascuna catena. Nelle prime settimane di vita dell'embrione abbiamo l'Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), l'Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), che compaiono prima del terzo mese di vita intrauterina. Compare quindi l'HbF ($\alpha_2\gamma_2$) e l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) e solo con la fine dello sviluppo fetale e dopo la nascita, si ha la sintesi della frazione minore rappresentata dall'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) che si stabilizza ad una percentuale relativa pari a circa il 3% dopo l'anno di vita. L'HbF scende a valori inferiori all'1% dopo 6-8 mesi dalla nascita. Ciascuna di queste diverse catene è soggetta a variazioni di cui abbiamo evidenza soprattutto con lo studio delle catene β e α mentre in

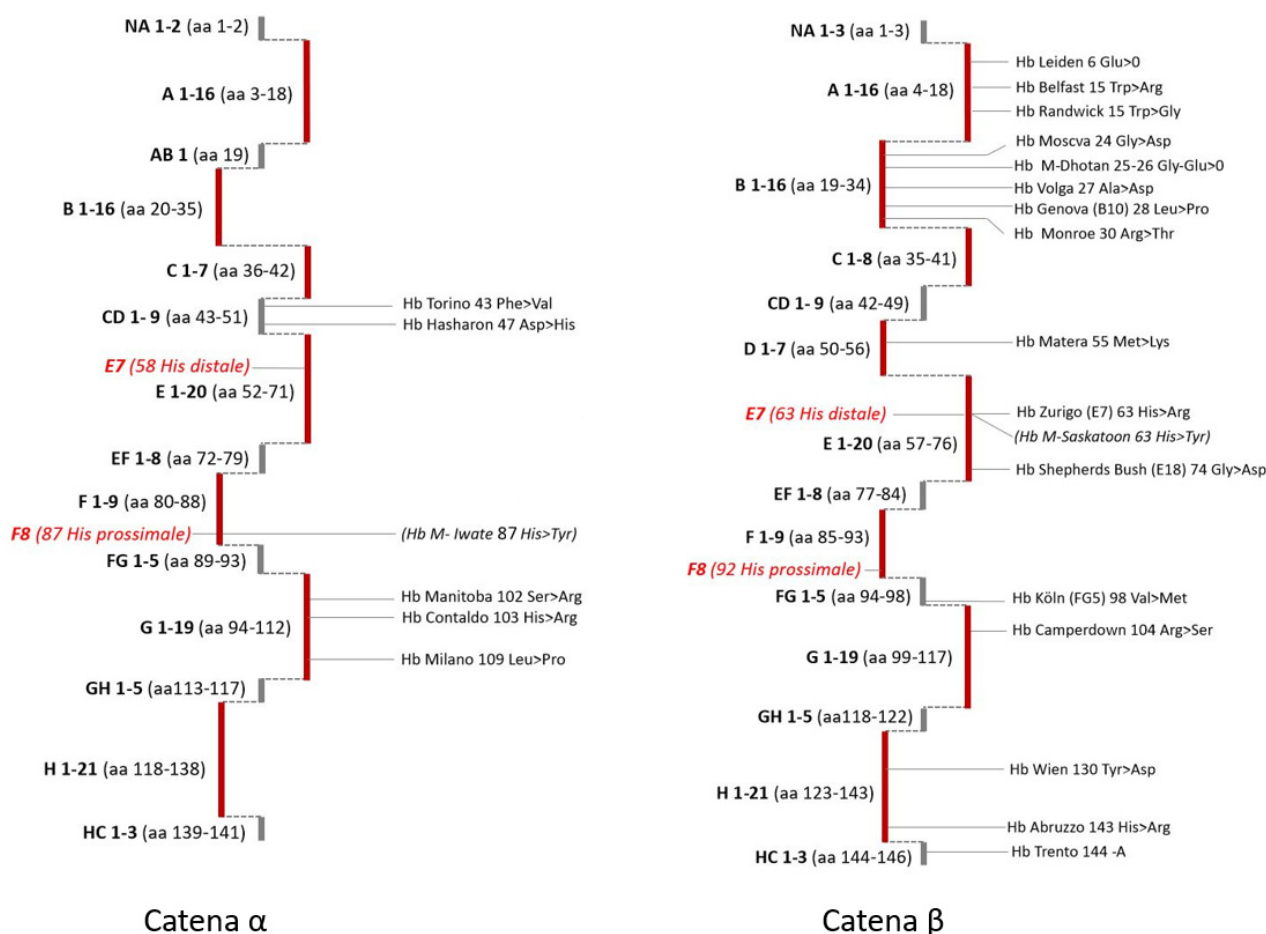


Figura 1

Schema delle catene α e β con evidenziate in rosso le porzioni ad α -elica ed in grigio quelle non ad α -elica. Sono riportate alcune delle varianti instabili caratterizzate nella popolazione italiana.

minor numero sono state descritte sulle catene γ e δ . Esistono differenze nella sequenza e nel numero degli amminoacidi (aa) (141 per le catene α e 146 per β , γ e δ); tuttavia, tutte le catene posseggono una struttura terziaria simile e ogni catena presenta per il 75% una configurazione ad α -elica. Il gruppo carbonilico degli aa forma lo scheletro che si ripiega su sé stesso dando origine ad otto porzioni ad α -elica denominati progressivamente da A ad H che si presentano separati tra loro da cinque segmenti non ad α -elica denominati rispettivamente AB, CD, EF, FG e GH. Ciascuna lettera o coppia di lettere viene contrassegnata con un numero che identifica la posizione del residuo amminoacidico all'interno di ogni tratto elicoidale e non elicoidale. Con questa denominazione, analoghe posizioni strutturali sono indicate nello stesso modo. Ad esempio: con F8 si identificano le istidine (His) prossimali in posizione 92 nelle catene β ed 87 nelle catene α , mentre con E7 vengono indicate le His distali situate rispettivamente in $\alpha 58$ e in $\beta 63$. Una schematizzazione di tale struttura è riportata nella Figura 1. L' α -elica ha una struttura spaziale caratteristica con avvolgimenti regolari e ogni tre o quattro aa si situa uno non-polare. Ciò condiziona la disposizione delle catene laterali di aa non-polari verso l'interno della molecola e il gruppo eme; catene laterali di aa polari sono invece disposte verso la superficie esterna della molecola Hb. Si viene così a creare un ambiente interno che tende a respingere l'acqua mentre gli aa polari o idrofili, rivolti verso la superficie esterna, contribuiscono a mantenere l'Hb in soluzione. La struttura terziaria è rafforzata dai legami idrogeno e dalle forze di Van der Waals tra le catene laterali di aa all'interno dell'elica, tra eliche vicine e tra globina ed eme. Questa architettura è perfettamente in equilibrio stabile, ma ogni minimo cambiamento che riesce ad esporre le parti interne all'acqua (ad esempio, una sostituzione amminoacidica) può contribuire a ridurre la stabilità e ad innescare la denaturazione (10).

I rapporti tra globina ed eme

Come già detto, l'eme nelle catene α e β è circondato da aa non-polari quasi simili. Vi sono 40 punti di interazione fra globina ed eme con il coinvolgimento di 19 aa delle catene α e 21 aa delle catene β . Tutti i legami sono non-polari eccetto quelli tra CD3 ed E10 in β e CD3 in α con gli acidi propionici della porfirina. Vi è poi il legame covalente tra le His in F8 e l'atomo di ferro (Fe) emico (11,12). Il ferro ha sei legami di coordinazione: quattro con gli atomi di azoto dei nuclei pirrolici della protoporfirina, uno con l'His prossimale e quindi uno, mediato dall'ossigeno (O_2), con l'His distale E7. La possibilità che il Fe^{2+} si combini reversibilmente con l' O_2 è soprattutto dovuta alla presenza degli aa non-polari che lo circondano. L'eme nella sua "tasca emica" è importante per stabilizzare la struttura terziaria dell'Hb;

la conformazione ad α -elica viene ridotta di 1/3 quando il gruppo emico è rimosso dalla molecola (13).

I rapporti tra le singole catene polipeptidiche

L'HbA, che rappresenta la quasi totalità dell'emoglobina in un individuo adulto (>96%), è formata da due catene α uguali tra loro e identificate convenzionalmente nel tetramero con α_1 e α_2 e da due catene β altrettanto uguali tra loro e a loro volta identificate con β_1 e β_2 . Per inciso, ricordiamo che le catene α sono sintetizzate in quantità diversa (in un rapporto di 3:1 dai due geni $\alpha 2$ (*HBA2*) e $\alpha 1$ (*HBA1*), ma tutte le catene α prodotte saranno identiche nella composizione aa (14). I contatti tra subunità identiche (α_1 - α_2) e (β_1 e β_2) interessano gli amminoacidi terminali delle catene, mentre quelli tra subunità non identiche sono più numerosi e sono di due tipi: α_1 - β_1 e α_1 - β_2 . Il contatto α_1 - β_1 è assicurato da 34 aa presenti prevalentemente nelle eliche G ed H e nella porzione non ad α -elica GH. Il contatto α_1 - β_1 coinvolge 19 aa situati prevalentemente nelle eliche C e G e nella porzione non ad α -elica FG. Il numero e la disposizione delle catene laterali degli aa sono tali per cui, mentre il contatto α_1 - β_1 consente solo piccoli movimenti, il contatto α_1 - β_2 permette movimenti molto più ampi ed è a questo livello che si hanno i più significativi movimenti tra le singole subunità durante il processo di ossigenazione dell'emoglobina. Occorre inoltre ricordare che il tetramero è in continuo equilibrio con lo stato di dimero e di monomero (15,16).

DIFETTI STRUTTURALI E INSTABILITÀ

Lo studio della struttura dell'Hb ha fatto comprendere come modificazioni delle normali interazioni fra catene laterali degli aa possono provocare instabilità di tutta la molecola. Nella maggior parte dei casi le Hb instabili derivano da mutazioni che interessano: i punti di legame tra eme e globina, i punti di interazione fra le catene polipeptidiche o la conformazione generale dell'Hb.

I punti di contatto con l'eme

Le sostituzioni di aa che presentano punti di contatto con l'eme o che sono situati nella parte interna della molecola presentano alterazioni diverse, sovente sono instabili con fenotipi molto eterogenei e talvolta difficilmente rilevabili dal laboratorio. Nelle Tabelle 1-4 sono elencate le varianti Hb, ad oggi note, che derivano dalle sostituzioni dei 40 residui aa coinvolti nei suddetti contatti (5,6). Osservando gli elenchi delle Tabelle, si comprende come i diversi fenotipi associati ai vari difetti risultino in relazione anche alla natura degli aa sostituenti o sostituiti.

Tabella 1

Varianti delle catene α globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche nei nove punti di contatto con l'eme fiancheggianti l'His distale [58 (E7)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Rotterdam: α 32(B13) Met>Arg; HBA2:c.98T>G	NO	I/T	?	SI
Hb Amsterdam: α 32(B13) Met>Ile; HBA2:c.99G>A α 39 (C4) (d)	NO	I/T	?	SI
Hb Torino: α 43(CE1) Phe>Val; HBA2:c.130T>G	NO	++	↓	NO
Hb Sens: α 43(CE1) Phe>Ile; HBA2:c.130T>A	NO	++	?	NO
Hb Hirosaki: α 43(CE1) Phe>Leu; HBA2:c.132C>G	NO	++	?	NO
Hb Vanvitelli: α 43(CE1) Phe>Leu; HBA1:c.130T>	NO	I/T	↓	NO
Hb Matsudo: α 45(CE3) His>Tyr; HBA1o2:c.136C>T	SI	-	?	NO
Hb Poitiers: α 45(CE3) His>Asp; HBA1o2:c.136C>G	SI	-	↑	NO
Hb Oita: α 45(CE3) His>Pro; HBA2:c.137A>C	SI	-	?	NO
Hb Fort de France: α 45(CE3) His>Arg; HBA1o2:c.137A>G	SI	+	↑	NO
Hb Bari: α 45(CE3) His>Gln; HBA1o2:c.138C>G	NO	-	N	NO
Hb Lake Tapawingo: α 46(CE4) Phe>Ser; HBA2:c.140T>C	SI	+	N	NO
Hb Hillingdon: α 46(CE4) Phe>Val; HBA1:c.139T>G	SI	?	?	NO
Hb Brigante: α 46(CE4) Phe>Ile; HBA2:c.139T>A	NO	?	?	NO
Hb M-Boston: α 58(E7) His>Tyr; HBA2:c.175C>T	SI	-	↓	NO
Hb Boghé: α 58(E7) His>Gln; HBA2:c.177C>A	NO	-	N	NO
Hb Flurlingen: α 58(E7) His>Gln; HBA2:c.177C>G	SI	?	?	NO
Hb Kırklareli: α 58(E7) His>Leu; HBA1:c.176A>T	SI	?	↓	NO
Hb Evans: α 62(E11) Val>Met; HBA2:c.187G>A	NO	++	?	NO
Hb Bishoptown: α 101(G8) Leu>Pro; HBA2:c.305T>C	NO	I/T	?	SI
Hb Utrecht: α 129(H12) Leu>Pro; HBA2:c.389T>C	NO	I/T	?	SI

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro", (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) non sono note varianti.

I/T, Iperinstabilità/Talassemia con test di instabilità negativi.

Instabilità e natura degli amminoacidi

In molti casi, l'instabilità globinica viene prodotta dalla sostituzione di un aa con uno di diverse dimensioni. Un esempio è fornito dall'alanina (Ala) che sostituisce la valina (Val) in posizione E11 nell'Hb Sidney β 67(E11) Val→Ala; HBB:c.203T>C (17); l'Ala, avendo dimensioni minori, non riesce a mantenere gli stessi legami che la Val normalmente stabilisce con l'eme. Il contrario si verifica con l'Hb Köln [β 98(FG5) Val→Met; HBB:c.295G>A] (18) dove la Val in FG5 è sostituita da una metionina (Met) di dimensioni maggiori. In questi casi le catene laterali degli aa devono essere ripiegate o all'interno o all'esterno con compromissione della stabilità della molecola. Ancora diversi effetti si hanno

con aa diversi che si sostituiscono nella stessa posizione. Un esempio è quello dell'His al codone 63 sulle catene β (E7) quando viene sostituita dall'arginina (Arg); in tal caso si avrà instabilità come accade con l'Hb Zurigo [β 63(E7) His→Arg; HBB:c.191A>G] (19,20). Si avrà invece una caratteristica metemoglobinemia quando l'His viene sostituita dalla tirosina (Tyr) nell'HbM Saskatoon [β 63(E7) His→Tyr; HBB:c.190C>T] (21). La sostituzione di un aa non-polare con uno polare in una regione idrofoba della molecola può essere altrettanto causa di instabilità, come si ha nell'Hb Riverdale-Bronx [β 24(B6) Gly→Arg; HBB:c.73G>C] (22) o nell'Hb Wien [β 130(H8) Tyr→Asp; HBB:c.391T>G] (23).

Particolarmente rilevante è l'effetto prodotto sulla

Tabella 2

Varianti delle catene α globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche nei dieci punti di contatto con l'eme fiancheggianti l'His proximale [87 (F8)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Barika: $\alpha 42(C7)$ Tyr>His; <i>HBA2:c.127T>C</i>	SI	++	?	NO
Hb Hauteluze: $\alpha 42(C7)$ Tyr>Cys; <i>HBA2:c.128A>G</i>	NO	++	?	NO
Hb Huaxi: $\alpha 42(C7)$ Tyr>Asp; <i>HBA2:c.127T>G</i>	SI	?	?	NO
Hb Erzeroum: $\alpha 42(C7)$ Tyr>Ser; <i>HBA1:c.128A>C</i>	SI	?	?	NO
Hb Les Andelys: $\alpha 83(F4)$ Leu>Pro; <i>HBA2:c.251T>C</i>	NO	++	?	NO
Hb Ahvaz: $\alpha 83(F4)$ Leu>Arg; <i>HBA2:c.251T>G</i>	SI	I/T	?	NO
Hb Ridgewood: $\alpha 86(F7)$ Leu>Val; <i>HBA2:c.259C>G</i>	SI	++	?	NO
Hb Moabit: $\alpha 86(F7)$ Leu>Arg; <i>HBA1o2:c.260T>G</i>	SI	++	↓	NO
Hb lwata: $\alpha 87(F8)$ His>Arg; <i>HBA1o2:c.263A>G</i>	SI	+(d)	↓	NO
Hb M-lwate: $\alpha 87(F8)$ His>Tyr; <i>HBA1o2:c.262C>T</i>	SI	N(d)	↓	NO
Hb Auckland: $\alpha 87(F8)$ His>Arg; <i>HBA1o2:c.262C>A</i>	SI	++	N	NO
Hb Port Phillip: $\alpha 91(FG3)$ Leu>Pro; <i>HBA1o2:c.275T>C</i>	SI	++	?	NO
Hb Kalavassos: $\alpha 91(FG3)$ Leu>His; <i>HBA2:c.275T>A</i>	SI	?	?	NO
Hb Zara: $\alpha 91(FG3)$ Leu>Ile; <i>HBA2:c.274C>A</i>	SI	+	?	NO
Hb Treviso: $\alpha 91(FG3)$ Leu>Phe; <i>HBA2:c.274C>T</i>	SI	+	↓	NO
Hb Bronte: $\alpha 93(FG5)$ Val>Gly; <i>HBA2:c.281T>G</i>	NO	I/T	?	SI
Hb Die: $\alpha 93(FG5)$ Val>Ala; <i>HBA1:c.281T>C</i>	NO	++	?	NO
Hb Fuchu-II: $\alpha 97(G4)$ Asn>His; <i>HBA2:c.292A>C</i>	NO	N	↑	NO
Hb Dallas: $\alpha 97(G4)$ Asn>Lys; <i>HBA2:c.294C>A</i> $\alpha 98(G5)$ (e)	SI	N	↑	NO
Hb Caen: $\alpha 132(H15)$ Val>Gly; <i>HBA2:c.305T>C</i>	SI	++	?	NO
Hb Chicago: $\alpha 136(H19)$ Leu>Met; <i>HBA2:c.409C>A</i>	SI	N	?	NO
Hb Bibba: $\alpha 136(H19)$ Leu>Pro; <i>HBA2:c.410T>C</i>	SI	++	?	NO
Hb Toyama: $\alpha 136(H19)$ Leu>Arg; <i>HBA1o2:c.410T>G</i>	NO	++	?	NO

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro"; (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) dissociazione in dimeri e/o cianosi e metHb; e) non sono note varianti.

I/T, Iperinstabilità/Talassemia con test di instabilità negativi; N, non instabilità.

stabilità di una catena globinica dall'inserimento di un residuo di prolina (Pro): la struttura ad anello di questo amminoacido di solito impedisce la formazione di una normale α -elica, ostacola la formazione della struttura terziaria e, quindi, la stabilità della subunità emoglobinica interessata. Questo accade in modo particolare quando un residuo di Pro sostituisce un residuo dei seguenti amminoacidi: Ala, leucina (Leu), serina (Ser) arginina (Arg) treonina (Thr) o His. Un

esempio per tutti è quello dell'Hb Genova [$\beta 28$ (B10) Leu→Pro; *HBB:c.86T>C*] (7). Occorre ancora osservare che l'aa Pro, per la sua struttura, può essere inserito in modo corretto esclusivamente nei segmenti non-elicoideali o nei primi tre siti di un segmento elicoidale; pertanto le varianti che presentano sostituzioni che rispettano tali "regole" non saranno instabili, ma potrebbero avere un'alterata affinità per l'O₂, come si ha nel caso dell'Hb Attleboro [$\alpha 138$ (H21) Ser→Pro; *HBA1* o *HBA2:c.415T>C*]

Tabella 3

Varianti delle catene β globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche nei dieci punti di contatto con l'eme fiancheggiati l'His distale [63 (E7)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Yokohama: β 31(B13) Leu>Pro; HBB:c.95T>C	NO	++	↓	NO
Hb Hakkari: β 31(B13) Leu>Arg; HBB:c. 95T>G	NO	++	?	NO
Hb Hazebrouck: β 38(C4) Thr>Pro; HBB:c.115A>C	SI	+	↓	NO
Hb Hinwil: β 38(C4) Thr>Asn; HBB:c.116C>A	SI	N	↑	NO
Hb Hammersmith: β 42(CD1) Phe>Ser; HBB:c.128T>C	NO	++	↓	NO
Hb Louisville: β 42(CD1) Phe>Leu; HBB:c.127T>C	NO	++	↓	NO
Hb Sendagi: β 42(CD1) Phe>Val; HBB:c.127T>G	NO	++	↓	NO
Hb Mississippi: β 44(CD3) Ser>Cys; HBB:c.134C>G	?	+	?	NO
Hb Cheverly: β 45(CD4) Phe>Ser; HBB:c.137T>C	NO	++	↓	NO
Hb Arta: β 45(CD4) Phe>Cys; HBB:c.137T>G	NO	+	↓	NO
Hb Zürich: β 63(E7) His>Arg; HBB:c.191A>G	SI	+	↑	NO
Hb M-Saskatoon: β 63(E7) His>Tyr; HBB:c.190C>T	NO	+	N/↑	NO
Hb Bicêtre: β 63(E7) His>Pro; HBB:c.191A>C	NO	++	N	NO
Hb Haná: β 63(E7) His>Asn; HBB:c.190C>A	SI	++	?	NO
Hb I-Toulouse: β 66(E10) Lys>Glu; HBB:c.199A>G	SI	++(d)	N	NO
Hb Chico: β 66(E10) Lys>Thr; HBB:c.200A>C	SI	++	↓	NO
Hb M-Milwaukee-I: β 67(E11) Val>Glu; HBB:c.203T>A	SI	N(d)	↓	NO
Hb Bristol-Alesha: β 67(E11) Val>Met; HBB:c.202G>A	NO	++	?	SI
Hb Sidney: β 67(E11) Val>Ala; HBB:c.203T>C	SI	++	?	NO
Hb Manukau: β 67(E11) Val>Gly; HBB:c.203T>G	NO	+	?	NO
Hb Christchurch: β 71(E15) Phe>Ser; HBB:c.215T>A	NO	N	N	NO
Hb Southampton: β 106(G8) Leu>Pro; HBB:c.320T>C	NO	++	↑	NO
Hb Tübingen: β 106(G8) Leu>Gln; HBB:c.320T>A	NO	++	↑	NO
Hb Terre Haute: β 106(G8) Leu>Arg; HBB:c.320T>G	NO	I/T	?	NO
Hb L'Aquila: β 106(G8) Leu>Val; HBB:c.319C>G	NO	?	?	SI

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro", (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) dissociazione in dimeri e/o cianosi e metHb.

I/T, Iperinstabilità/Talassemia con test di instabilità negativi; N, non instabilità.

(24), o avere un comportamento "normale", come accade con l'Hb Valletta [β 87(F3) Thr→Pro; HBB:c.262A>C] (25).

Infine, quando è un residuo di Pro ad essere sostituito da Ala o Ser o Arg o Thr o His, difficilmente si

avranno varianti Hb instabili, ma più frequentemente varianti con una affinità aumentata per l'O₂, come nel caso dell'Hb Brigham [β 100(G2) Pro→Leu; HBB:c.302C>T] (26).

Tabella 4

Varianti delle catene β globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche negli undici punti di contatto con l'eme fiancheggiati l'His prossimale [92 (F8)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Mequon: $\beta 41(C7)$ Phe>Tyr; <i>HBB</i> :c.125T>A	NO	++	N	NO
Hb Denver: $\beta 41(C7)$ Phe>Ser; <i>HBB</i> :c. 125T>C	NO	+	↓	NO
Hb Seattle: $\beta 70(E14)$ Ala>Asp; <i>HBB</i> :c.212C>A	SI	+	↓	NO
Hb Borás: $\beta 88(F4)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.266T>G	SI	+	?	NO
Hb Santa Ana: $\beta 88(F4)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.266T>C	SI	++	?	NO
Hb Sabine: $\beta 91(F7)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.275T>C	SI	++	?	NO
Hb Caribbean: $\beta 91(F7)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.275T>G	SI	+	↓	NO
Hb M-Milwaukee-2: $\beta 92(CF8)$ His>Tyr; <i>HBB</i> :c.277C>T	SI	+(d)	N	NO
Hb J-Altgeld Gardens: $\beta 92(F8)$ His>Asp; <i>HBB</i> :c.277C>G	SI	+	N	NO
Hb Redondo: $\beta 92(F8)$ His>Asn; <i>HBB</i> :c.277C>A	SI	++	N/↑	NO
Hb Mozhaik: $\beta 92(F8)$ His>Arg; <i>HBB</i> :c.278A>G	SI	++	↑	NO
Hb Newcastle: $\beta 92(F8)$ His>Pro; <i>HBB</i> :c.278A>C	SI	++	?	NO
Hb Saint Etienne: $\beta 92(F8)$ His>Gln; <i>HBB</i> :c.279C>G o C>A	SI	++	↑	NO
Hb Regina: $\beta 96(FG3)$ Leu>Val; <i>HBB</i> :c.289C>G	NO	N	↑	NO
Hb Debrousse: $\beta 96(FG3)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.290T>C	NO	++	↑	NO
Hb Köln: $\beta 98(FG5)$ Val>Met; <i>HBB</i> :c.295G>A	SI	++	↑	NO
Hb Nottingham: $\beta 98(FG5)$ Val>Gly; <i>HBB</i> :c.296T>G	SI	++	↑	NO
Hb Djelfa: $\beta 98(FG5)$ Val>Ala; <i>HBB</i> :c.296T>C	SI	++	↑	NO
Hb Mainz: $\beta 98(FG5)$ Val>Glu; <i>HBB</i> :c.296T>A	SI	++	?	NO
Hb Richmond: $\beta 102(G4)$ Asn>Lys; <i>HBB</i> :c.309C>A o C>G	SI	N(e)	↑	NO
Hb Kansas: $\beta 102(G4)$ Asn>Thr; <i>HBB</i> :c.308A>C	SI	+	↓	NO
Hb Beth Israel: $\beta 102(G4)$ Asn>Ser; <i>HBB</i> :c.308A>G	SI	+(d)	↓	NO
Hb Saint Mandé: $\beta 102(G4)$ Asn>Tyr; <i>HBB</i> :c.307A>T	SI	N(d)	↓	NO
Hb Heathrow: $\beta 103(G5)$ Phe>Leu; <i>HBB</i> :c.312C>G	NO	N	↑	NO
Hb Saint Nazaire: $\beta 103(G5)$ Phe>Ile; <i>HBB</i> :c.310T>A	NO	N	↑	NO
Hb Allentown: $\beta 137$ GTG>TGG Val>Trp; <i>HBB</i> :c.412_413delinsTG	NO	++	↓	NO
Hb Stara Zagora: $\beta 137-139$ (-TGGCTA) Val-Ala-Asn >Asp; <i>HBB</i> :c.413_418delTGGCTA	NO	I/T	N	SI
Hb Olmsted: $\beta 141(H19)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.425T>G	NO	++	?	NO

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro"; (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) dissociazione in dimeri e/o cianosi; e) formazione di ibridi asimmetrici.

I/T, Iper-instabilità/Talassemia con test di instabilità negativi; N, non instabilità.

Altre cause di instabilità e comportamenti caratteristici

Una sostituzione che coinvolge un aa che partecipa al contatto α - β 1 può rendere più debole tale contatto. Occorre infatti ricordare che il tetramero dell'Hb è in continuo equilibrio con lo stato di dimero e di monomero e quindi una sostituzione al contatto α - β 1 può essere in grado di spostare l'equilibrio tetramero \rightarrow dimero verso la forma di monomero, come accade ad esempio con l'Hb Philly: [β 35(C1) Tyr \rightarrow Phe; HBB:c.107A>T] (27).

Lo stesso aa nella stessa posizione e in catene diverse può dare origine a varianti instabili anche quando viene sostituito con aa diversi. Esempi li abbiamo quando un residuo di fenilalanina (Phe) in posizione CD1 nelle catene β viene sostituito per dare l'Hb Hammersmith [β 42(CD1) Phe \rightarrow Ser; HBB:c.128T>C] (28), l'Hb Louisville [β 42(CD1) Phe \rightarrow Leu; HBB:c.127T>C] (29) e in posizione corrispondente delle catene α nell'Hb Torino [α 43(CD1) Phe \rightarrow Val; HBA2:c.130T>G] (8).

Una catena globinica può risultare instabile quando presenta un amminoacido deletato dando così origine a tetrameri instabili, come nel caso dell'Hb Boyle Heights [α 6(A4) Asp \rightarrow 0; HBA1 o HBA2:c.19_21delGAC] (30), dell'Hb Leiden [β 6(A3) Glu \rightarrow 0; HBB:c.22_24delGAG] (31) oppure dell'Hb Freiburg [β 23(B5) Val \rightarrow 0; HBB:c.70_72delGTT] (32).

Quando nel terzo esone dei geni α o β sono presenti microdelezioni nucleotidiche, il segnale di "stop" cambia posizione; in alcuni casi è la stessa tripletta di "stop" ad essere mutata. Quando tali cambiamenti si verificano, le catene globiniche che riescono ad essere sintetizzate avranno un numero variabilmente maggiore di amminoacidi (oltre 146 per le catene β) e la loro lunghezza dipenderà dalla posizione e dal tipo di mutazione nel gene. I successivi tetrameri che potranno formarsi con queste catene anomale saranno instabili. Un esempio è quello dell'Hb Trento [β 144 (-A); HBB:c.434delA] (9) che presenta anche un'alterata affinità per l'O₂. In altri casi, varianti β iper-instabili si associano invece a fenotipi apparentemente talassemici; le catene mutate subiscono infatti una proteolisi così rapida, precipitando subito dopo la sintesi, da non essere in grado di formare un tetramero emoglobinico. Pertanto, in questi casi, i difetti globinici non sono rilevabili con i metodi separativi quali-quantitativi normalmente utilizzati, ma possono produrre incrementi dell'HbA₂, mentre i test utilizzati per determinarne l'instabilità *in vitro* (33) saranno, nella maggior parte dei casi, negativi. Tali β varianti iper-instabili possono contribuire a produrre quadri clinici complessi, simil- β -talassemici, non-trasfusione-dipendenti (NTDT) o, in casi più rari, anche trasfusione-dipendenti (TDT). Un esempio di comportamento intermedio con necessità di sporadiche trasfusioni è quello fornito dall'Hb Brescia (Hb Durham-NC) [β 114(G16) Leu \rightarrow Pro; HBB:c.344T>C], descritta in associazione al triplo gene α (34).

Sono noti anche diversi casi di catene α allungate;

queste si associano a quadri definiti iper-instabili, con una sintesi ridotta o assente di catene globiniche che comunque, se prodotte in minima quantità, risultano instabili e non in grado di formare tetrameri funzionanti. Si avranno fenotipi talassemici particolarmente marcati quando le varianti iper-instabili vengono co-ereditate con difetti α talassemici classici. Tra queste varianti vi sono: l'Hb Constant Spring [142, Stop \rightarrow Gln; HBA2:c.427T>C] (35) riscontrata in diverse popolazioni anche associata ad α talassemia in soggetti con HbH, l'Hb Koya Dora [α 142 Stop \rightarrow Ser; HBA2:c.428A>C] (36) e l'Hb Quong Sze [α 125(H8) Leu \rightarrow Pro; HBA2:c.377T>C] (37) presente soprattutto in popolazioni asiatiche dove sono prevalenti le α talassemie da due geni deleti.

Può essere interessante osservare ancora che studi relativamente recenti hanno permesso di considerare che la stabilizzazione delle catene α globiniche può essere favorita da una proteina prodotta a livello dei precursori eritroidi, l'Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP). Questa proteina forma un complesso con le catene α globiniche che impedisce l'ossidazione e la precipitazione all'interno dei precursori eritrocitari del midollo osseo e che previene l'apoptosi e l'anomala eritropoiesi. Ciò è stato dimostrato inizialmente nei casi di talassemia major (38,39). Successivamente, sono state osservate diverse varianti α globiniche con sostituzione aa in posizioni prossime all'area di contatto tra catene α e AHSP che causano instabilità e comportamenti simil-talassemici. Ciò ha contribuito a dimostrare che l'azione stabilizzatrice dell'AHSP poteva essere ridotta o annullata in particolari circostanze (40,41).

Altre catene globiniche instabili

Abbiamo considerato fin qui i meccanismi fisiopatologici che caratterizzano gran parte dei fenotipi associati alle varianti instabili delle catene α e β globiniche, varianti che costituiscono la quasi totalità dei difetti Hb "instabili" riportati nei database (5,6). Pochissimi sono invece i casi segnalati che riguardano comportamenti "instabili" delle catene δ e γ . Tutte le catene non- α sono tra loro strutturalmente simili poiché presentano notevoli omologie e analoghe cause di instabilità, ma per motivi diversi, i fenotipi prodotti dalle anomalie delle catene δ e γ risultano meno noti o rilevanti. Poiché le catene δ , che costituiscono l'HbA₂, sono correttamente valutabili solo dopo il primo anno di vita e la loro capacità sintetica è di circa 30 volte inferiore a quella delle catene β , si comprende come sia scarsa o nulla l'incidenza che le varianti delle catene δ hanno sull'emoglobina circolante, sui parametri eritrocitari e, quindi, sui vari esami di laboratorio eventualmente utilizzati per determinarne l'instabilità *in vitro*. Pertanto solo una ridotta quantità di HbA₂ rilevata dai sistemi separativi, unita all'assenza o a una minima presenza di frazione anomala (HbA₂-X), può segnalare un difetto di sintesi o l'instabilità delle catene δ . Come già detto in precedenza, tale osservazione o caratterizzazione è

ininfluente per quanto riguarda gli effetti sul fenotipo clinico atteso, mentre la conferma di una variazione del gene δ può essere importante per la corretta valutazione dell'HbA₂ totale nell'ambito della prevenzione per la β talassemia (42,43).

Le varianti delle catene γ , impegnate a formare il tetramero $\alpha_2\gamma_2$, si possono invece osservare quando l'HbF è presente in quantità rilevante; nella norma ciò accade prevalentemente nel neonato poiché presenta un'Hb Fetale attorno al 70-80%. L'HbF è prodotta in diversa quantità dai due geni *HBG1* e *HBG2*, con un rapporto relativo tra le catene prodotte G γ /A γ , pari a circa 7:3 alla nascita e circa 2:3 nell'adulto, quando l'HbF continua ad essere sintetizzata per cause diverse. Si avrà pertanto una quantità diversa di catene γ anomale nel caso in cui una mutazione interessi l'uno o l'altro gene. Lo switch fisiologico dell'HbF, entro 4-8 mesi dalla nascita, porterà alla sostituzione con l'HbA e quindi alla scomparsa dell'anemia quando prodotta da una mutazione dei geni γ . Non essendo normalmente previsto l'esame dell'assetto Hb alla nascita per tutti i nati, se non in particolari situazioni di screening mirato all'HbS, osservare una variante dell'HbF in un neonato potrà accadere solo se nel lasso di tempo di 4-8 mesi dalla nascita si verificano condizioni di ittero persistente o anemia marcata o valori elevati di metaemoglobina (metHb) (44-47) che possono suggerire l'esame dell'assetto Hb.

Varianti instabili e affinità per l'ossigeno

La maggior parte delle Hb instabili presenta un'alterata affinità per l'O₂ in seguito ai cambiamenti intervenuti nella struttura dell'Hb e nei rapporti modificati con gli effettori allosterici, in primo luogo con il 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (48). Esempi di varianti con affinità diminuita sono: l'Hb Torino, l'Hb Hammersmith, l'Hb Seattle (8,28,49); quelli di varianti con affinità aumentata sono: l'Hb Köln, l'Hb Zurigo, l'Hb Freiburg, l'Hb Shepherd's Bush (50-52). L'andamento della curva di dissociazione dell'ossi-Hb dipende dalla conformazione della globina nella sua parte che circonda il gruppo eme, dipende anche dagli aa che intervengono nell'effetto Bohr e da quelli che legano il 2,3-DPG. Questi aa sono quelli che più frequentemente vengono coinvolti nelle sostituzioni che portano all'instabilità dell'Hb. Le varianti Hb con affinità aumentata non instabili mostrano eritrocitosi (53) ed ematocrito elevato, tale comportamento è meno evidente quando le varianti sono anche instabili (54,55). Le varianti instabili con affinità diminuita potranno associarsi a cianosi che sarà più marcata con varianti β , meno con varianti α ; di solito tale fenomeno è in relazione alla quantità di variante circolante che per le varianti α potrà dipendere dalla loro eventuale associazione con difetti α -talassemici (56). In letteratura è descritto che i soggetti portatori di varianti con bassa affinità o anemia marcata possono presentare una bassa saturazione dell'ossigeno e quindi intervalli sensibilmente diminuiti, inferiori a 89% (57-59).

Varianti instabili omozigoti o in associazione con difetti talassemici

Come detto più sopra, le varianti Hb instabili sono molto rare e si trasmettono con caratteristiche dominanti. Bastano queste due considerazioni per comprendere come possa essere poco probabile riscontrare tali varianti allo stato omozigote. Un raro caso riportato in letteratura (60) è quello di una ragazza di 13 anni (figlia di cugini di primo grado) con Hb Bushwick: [β 74(E18) Gly→Val; *HBB*:c.224G>T] allo stato omozigote, tale variante allo stato eterozigote può essere considerata di tipo 2 (Tabella 5), instabile *in vitro* e *in vivo*, ma senza segni emolitici rilevanti, mentre allo stato omozigote produce una grave anemia emolitica che richiede sporadiche trasfusioni (60). Più frequenti sono i casi di composti eterozigoti tra variante instabile e difetto β -talassemico che manifestano situazioni molto eterogenee e che dipendono dal tipo di instabilità della variante coinvolta (Tabella 5) e dal tipo di difetto talassemico (β^0 , β^+ , β^{**}) (61-64). Analogamente accade con le α varianti instabili co-ereditate con le α talassemie (65). Verosimilmente si può ipotizzare una maggior gravità e la necessità di trasfusioni regolari o incompatibilità con la vita quando si dovessero presentare varianti β particolarmente instabili allo stato omozigote (Tabella 5: tipi 0 o 1 o 2) o in composti con β talassemia.

Dalle evidenze prodotte da β talassemie allo stato omozigote (NTDT, ma associate a modificatori migliorativi delle espressioni fenotipiche), è possibile che la co-ereditarietà di persistenza ereditaria di HbF (HPFH) e di difetti α talassemici (riducendo entrambe lo squilibrio tra le catene α e non- α) contribuisca, anche nel caso delle β varianti instabili, a ridurre l'anemia e, quindi, a migliorare le condizioni cliniche generali.

Instabilità di particolari emoglobinopatie

Instabilità dell'HbE

L'HbE [β 26(B8) Glu→Lys *HBB*:c.79G>A] allo stato eterozigote è assolutamente asintomatica e non comporta alcun problema di anemia emolitica. Tuttavia l'HbE, la variante più diffusa al mondo dopo l'HbS, merita un cenno in quanto viene talvolta riportata come variante instabile nei casi in cui se ne osserva il comportamento *in vitro* con agenti ossidanti (66) o in soggetti con febbre elevata da varie cause, soprattutto in concomitanza con numerose malattie infettive (67). È stato anche dimostrato che l'HbE viene sintetizzata a una velocità leggermente ridotta in quanto tale mutazione determina nel gene un sito di giunzione criptico che causa una trascrizione anomala dell'RNA messaggero (68). Per meglio comprendere questo meccanismo, occorre tener conto che il normale sito di "splicing" deve competere con questo nuovo sito di giunzione criptico e ne deriva che il livello risultante di RNA messaggero β -E sarà ridotto (69). Viene così a determinarsi un fenotipo equiparabile ad una forma lieve di β talassemia. Si

Tabella 5

Caratteristiche delle varianti emoglobiniche instabili in relazione alla causa che ha determinato l'instabilità, alla presentazione clinica, alla diagnosi, e confronto con i classici difetti talassemici

Tipo	Causa	Anemia	Test di instabilità	Fenotipo clinico
1	La catena polipeptidica è così instabile che si denatura subito dopo la sintesi (iperinstabile)	Anemia lieve	Negativi	Comportamento talassemico intermedio-marcato quando la variante è associata a talassemie
2	La catena polipeptidica si forma ma viene nel tempo costantemente distrutta e quindi risulta in quantità ridotta	Anemia emolitica cronica (sopravvivenza eritrocitaria molto ridotta)	Positivi (+++)	Possono rendersi necessarie sporadiche trasfusioni anche allo stato eterozigote
3	La variante Hb si forma ed è stabile ma si denatura solo in seguito a stress ossidativi o febbre elevata	Emolisi acuta con anemia durante gli episodi emolitici	Positivi (++)	Di solito non necessarie trasfusioni, fenotipo intermedio-marcato quando la variante è associata a talassemie
4	La variante Hb si forma in quantità normale o leggermente ridotta. Lieve denaturazione con sostanze ossidanti	Anemia lieve o assente	Positivi (+)	Normale. Fenotipo intermedio-lieve quando la variante è associata a talassemie
0	Il gene globinico non consente la sintesi parziale o totale della catena polipeptidica	Anemia lieve, non significativa in eterozigosi	Negativi	Trasfusioni non necessarie allo stato eterozigote. In composti eterozigoti: NTDT o TDT

NTDT, *Talassemie Non-Trasfusione-Dipendenti*; TDT, *Talassemie-Trasfusione-Dipendenti*.

comprende pertanto come la quantità relativa di HbE così prodotta (25-30% allo stato eterozigote), inferiore ai valori che si osservano nelle varianti β -globiniche, non dipende tanto dalla sua denaturazione o lieve instabilità, quanto dalla sintesi diminuita che le conferisce un comportamento simil-tallemico. Ciò si evidenzia particolarmente nei quadri clinici prodotti dai composti eterozigoti con i difetti talassemici β^0 o β^+ (70,71).

Instabilità dell'Hb Hasharon

La variante Hb Hasharon [α 47(CE5) Asp \rightarrow His; HBA2:c.142G>C] è stata inizialmente descritta in famiglie di ebrei ashkenaziti, per la prima volta nel 1967 in Israele (72,73), poi in Lituania e anche negli Stati Uniti (74). In Italia è stata descritta per la prima volta nel 1975 nel Polesine (province di Rovigo e Ferrara) dove ne è stata accertata una prevalenza pari a circa lo 0,8% della popolazione (75). Tale significativo riscontro sembra dovuto alle molte famiglie di ebrei provenienti dall'Europa del Nord-Est che si insediarono proprio nel Delta del Po attorno al XV secolo (74). Nella maggior parte dei casi l'Hb Hasharon è stata associata ad una lieve anemia emolitica dovuta ad una instabilità della molecola Hb, moderatamente termolabile, e sensibile a sostanze ossidanti (76,77). Un aspetto invece controverso è sempre apparso quello relativo alla quantità di variante rilevata nei numerosi casi studiati nel tempo nelle varie popolazioni. I primi casi riportavano percentuali inferiori al 20%, mentre i successivi studi effettuati in Italia hanno sovente riscontrato la variante in quantità superiore al 25-30%, ovviamente quando essa non era associata a β talassemia. È stato quindi dapprima ipotizzato che la diversa percentuale potesse

dipendere dal tipo di gene α mutato, HBA1 o HBA2; in un secondo tempo è stato dimostrato infatti che l'Hb Hasharon, nei soggetti studiati nel Delta del Po, era conseguente ad una mutazione del gene HBA2 che, come è noto, esprime una sintesi maggiore di catene α (78). Inoltre la variante veniva trasmessa "in cis" con l' α -talassemia -3,7kb (79,80), caratteristica che contribuisce a sua volta ad incrementare la quantità relativa di Hb Hasharon. Pertanto la variante, in base alla sua lieve instabilità e alle sue caratteristiche emolitiche, può essere inserita nel gruppo 4 di Tabella 5, leggermente instabile; essa esprime caratteristiche emolitiche più evidenti quando è associata ad α talassemia con almeno due geni non funzionanti. Quest'ultima caratteristica è stata osservata in un neonato prematuro che presentava l'HbF^{Hasharon} associata ad un fenotipo particolarmente marcato, in quantità prossima al 50%. L'importante anemia emolitica descritta in tale neonato si è risolta solamente dopo lo switch dell'HbF dimostrando che il tetramero $\gamma_2\alpha_2^{\text{Hasharon}}$ risulta particolarmente instabile (81).

Instabilità dell'HbH

Nel caso dell'HbH (β_4) siamo invece di fronte ad un tetramero particolare che si forma dall'eccesso di catene β nelle cellule eritroidi, in presenza di α talassemia con tre geni non funzionanti. La sindrome che si produce viene definita emoglobinosi H ed esprime un fenotipo ematologico e clinico molto simile alle forme di Talassemia Intermedia e, per questo, oggi classificata tra le condizioni NTD, con fenotipi clinici più marcati quando sono coinvolti difetti α da non-delezione (65). L'HbH si evidenzia normalmente con i diversi metodi

separativi in quantità variabile, in relazione ai difetti talassemici che producono l' α talassemia e all'invecchiamento del campione in esame. Tuttavia, la marcata instabilità dell'HbH fa sì che si osservino caratteristiche proprie delle emoglobine instabili: si degrada facilmente ed in ambiente ossidante precipita a formare le tipiche inclusioni eritrocitarie con danno ossidativo alle membrane delle cellule eritroidi. I portatori di questa particolare Hb possono quindi sviluppare episodi acuti di anemia emolitica in presenza di infezioni, esposizione a farmaci o a sostanze ossidanti e presentano frequentemente splenomegalia con fenotipi variabilmente marcati, anche questo è in relazione ai difetti dei geni α coinvolti. L'HbH mostra inoltre un'affinità molto elevata per l'ossigeno ed una cooperatività assente, per cui non risulta fisiologicamente utilizzabile per trasportare o cedere l'O₂ (82-84).

Varianti instabili ed emoglobina glicata

L'utilizzo dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) per la diagnosi e il monitoraggio del diabete mellito richiede di porre attenzione ad alcuni fattori essenziali, nell'ottica di una buona concordanza tra i valori di glicazione e le concentrazioni di glucosio nel sangue (85). Tra le cause che possono modificare il valore dell'HbA_{1c} vi è la ridotta sopravvivenza eritrocitaria. L'età media degli eritrociti nei pazienti che presentano anemia emolitica, con perdita di sangue acuta o cronica, risulta sensibilmente più bassa e ciò, come in precedenza detto, si esprime in modi e gradi diversi nei portatori di varianti instabili dell'Hb. Se tale condizione non è nota, gli esami di laboratorio possono indicare valori di HbA_{1c} sottostimati e indurre conseguentemente in errore la diagnosi e la valutazione conclusiva di una eventuale condizione diabetica (86-88). Occorre anche considerare che, nell'ambito della ricerca della condizione diabetica, valori particolarmente ridotti dell'HbA_{1c} possono essere indicatori di una condizione di diminuita sopravvivenza eritrocitaria e/o di uno stato emolitico non osservato in precedenza (89).

Varianti instabili ed ereditarietà

La maggior parte dei difetti talassemici e strutturali dell'Hb è caratterizzata da alterazioni ereditarie che si trasmettono secondo modalità autosomica recessiva e che sono clinicamente asintomatiche allo stato eterozigote. Esistono alcune eccezioni rappresentate da difetti rari associati ad instabilità della struttura tetramericca dell'Hb, a fenomeni emolitici più o meno marcati e a fenotipi altrettanto importanti. Ciò accade con molte varianti instabili che presentano un modello di ereditarietà autosomica dominante (90). Sono soprattutto le varianti delle catene β globiniche a presentarsi con questa modalità anche allo stato eterozigote, mentre alle varianti instabili delle catene α occorre l'associazione con difetti α talassemici per manifestare fenotipi clinici importanti (65). È stato anche osservato che le varianti instabili presentano una frequenza più elevata di mutazioni *de novo*, soprattutto delle catene β (91). In letteratura esistono diversi casi di

individui con difetti Hb i cui genitori non manifestano o, comunque, non presentano tali difetti nel loro corredo genetico. Tali situazioni possono avere origine da mosaici genetici (eventi "nuovi" che si verificano per la prima volta in un soggetto). In letteratura sono riportati inoltre casi *de novo* prodotti da errate interpretazioni, soprattutto situazioni nelle quali non sono state eseguite le indagini genetiche appropriate sui familiari a supporto delle conclusioni (92-94).

Altri aspetti associati alle varianti Hb instabili

Fattori esogeni causativi di fenomeni emolitici

L'emolisi associata alle varianti instabili dell'Hb può manifestarsi in vari modi ed essere prodotta da cause diverse (Tabella 5). In particolare, gli episodi emolitici acuti sono frequentemente associati alla somministrazione di farmaci definiti ossidanti i quali, nella fase iniziale della reazione, permettono il trasferimento di un elettrone dal farmaco all'ossiemoglobina per dare metaemoglobina e H₂O₂, come accade ad esempio con i sulfonamidi (Hb Zurigo). L'emolisi acuta può anche verificarsi a causa della piressia associata ad infezioni a carico, prevalentemente, del tratto respiratorio superiore. L'innalzamento della temperatura corporea di alcuni gradi può accelerare la disgregazione dell'emoglobina intracellulare a tal punto da causare una crisi emolitica (95).

La splenectomia

I globuli rossi danneggiati dal materiale denaturato che precipita al loro interno, passano nella milza e vengono successivamente rimossi dai macrofagi splenici. La conseguente splenomegalia potrebbe quindi comportare la splenectomia come approccio terapeutico nella gestione dei pazienti, tuttavia le evidenze non sono concordi nel ritenere sempre vantaggiosa tale soluzione. Le casistiche riportate in letteratura su soggetti con emoglobine instabili a cui è stata asportata la milza suggeriscono infatti una attenta valutazione delle complicanze, dovute soprattutto ad eventi trombotici, considerando i benefici prodotti (96-99). Pertanto, le recenti raccomandazioni prodotte sull'argomento suggeriscono di ricorrere alla splenectomia solo in caso di anemia grave e/o splenomegalia massiva o sintomatica (100).

I PERCORSI DIAGNOSTICI DI LABORATORIO

Il ruolo del laboratorio nella differenziazione, individuazione e caratterizzazione delle varianti instabili dell'Hb è rimasto nel tempo fondamentale e insostituibile poiché consente al clinico la gestione dei pazienti affetti da una patologia con espressioni eterogenee, una corretta consulenza genetica ed una adeguata prevenzione. In generale, l'approccio diagnostico di 1° livello ai difetti dell'Hb è previsto in molti laboratori, ma spesso, in presenza di difetti talassemici o strutturali complessi, si rende necessario ricorrere al supporto di

laboratori di riferimento. Normalmente gli esami specifici per la ricerca della condizione di portatore di un difetto globinico vengono prescritti a soggetti asintomatici, in altri casi vi possono essere segni e sintomi che fanno già propendere il clinico per la presenza di emoglobinopatie e su questa base viene formulato il quesito clinico. È il caso di pazienti che presentano fenotipi ematologici suggestivi per anemie emolitiche. Tali soggetti sono in prevalenza neonati o bambini che in qualche caso, prima o al compimento dello switch dell'HbF, manifestano stati anemici caratteristici. Conseguentemente, possono pervenire al laboratorio richieste specifiche per la conferma o l'accertamento delle cause di generici stati di anemia. Occorre osservare che il riscontro o il sospetto di una variante Hb non comporta sempre da parte del clinico l'esigenza urgente di una caratterizzazione molecolare, mentre prevale la necessità di conoscerne gli aspetti funzionali e le cause della sintomatologia. Ecco quindi come in questi casi il "laboratorio intermedio di riferimento" rivesta un ruolo importante per rispondere a quesiti più urgenti per la gestione del paziente, mediante esami funzionali o di conferma. Ciò accade soprattutto quando si sospetta un difetto instabile dell'Hb o un'alterata affinità per l'O₂; tuttavia il percorso diagnostico dovrà essere in primo luogo orientato verso esami specifici con potere discriminante nell'ambito delle anemie emolitiche (101). Informazioni sulla familiarità per difetti emoglobinici o comunque informazioni anamnestiche sul soggetto in esame potranno rendere più mirato e veloce tale percorso analitico (102). Nel caso delle anemie emolitiche, specie quando si presentano in forma acuta, una diagnosi in tempi brevi può essere importante, considerando che tali eventi si possono riscontrare in soggetti più fragili come nei neonati o nella prima infanzia.

Nella Tabella 6 sono riportati gli esami ed un commento breve ad alcuni risultati in presenza di varianti instabili. Poiché l'eterogeneità dei difetti genetici si accompagna ad una varietà di fenotipi che difficilmente possono essere riassunti in uno schema o un elenco, le risultanze riportate nella tabella corrispondono alle principali evidenze. Occorre anche osservare che, al di là dei casi direttamente studiati e conclusi dagli autori, le informazioni prodotte negli anni e riportate in letteratura possono essere talvolta discordanti o parziali. Ne consegue che la rarità dei difetti, alcuni dei quali caratterizzati in tempi lontani con metodi diversi, non consente di risalire sempre a comportamenti privi di ambiguità, confrontabili o facilmente classificabili. È per tutti questi motivi che quanto riportato nei vari database deve essere considerato con cautela. Dagli anni '80, in modo crescente, le indagini molecolari ci hanno consentito di accertare più facilmente e più precisamente anche la presenza di vari modificatori genetici, talvolta significativi nelle presentazioni fenotipiche associate ai diversi difetti globinici. (103,104).

1° Livello diagnostico

Parametri e indicatori eritrocitari

È noto come alcuni parametri eritrocitari [il volume cellulare medio (MCV), il contenuto cellulare medio di emoglobina (MCH), la concentrazione totale di emoglobina (Hb) e il numero di globuli rossi (GR)] costituiscano dei riferimenti importanti e irrinunciabili nella diagnosi di laboratorio delle talassemie (105), mentre non hanno in genere lo stesso peso nell'identificazione delle varianti emoglobiniche che in gran parte sono asintomatiche. Nel caso particolare delle varianti instabili tali parametri devono invece essere sempre considerati, anche se in molti casi si discostano poco dalla norma. Le varianti iper-instabili possono presentare valori di MCV diminuiti in diversa misura e, quando è presente la denaturazione completa della globina instabile, si verifica una diminuzione del MCH, simile a quello che si osserva nella β -talassemia. Sarà sempre importante conoscere il valore dell'Hb per poter valutare il grado di una potenziale anemia emolitica. I classici parametri (MCV ed MCH) saranno comunque importanti per determinare anche l'eventuale presenza di trait talassemici associati alle varianti instabili in composti di solito clinicamente significativi. Una valutazione particolare merita l'ematocrito (HCT) che generalmente, con valori elevati (superiori a 50 L/L), indica un potenziale aumento dell'affinità per l'ossigeno (O₂), mentre nei casi di varianti instabili, si presenta sempre con valori pressoché normali, anche quando vi è aumentata affinità. L'anemia emolitica, che si osserva in misura diversa in molte varianti classificate instabili, è dovuta alla precoce distruzione di eritrociti, in particolare quando la velocità di distruzione è maggiore della capacità del midollo osseo di rimpiazzarli. Pertanto, durante l'emolisi, i globuli rossi diminuiscono, il midollo è stimolato a produrne di nuovi e i reticolociti in circolo risultano aumentati. È quindi chiaro che la deviazione dei diversi parametri dai valori di riferimento sarà in relazione ai livelli di denaturazione che subiranno le catene globiniche e, quindi, alla conseguente distruzione dei globuli rossi. La morfologia eritrocitaria non risulta molto alterata se si escludono le modificazioni, dovute anche alla marcata ipocromia, durante i fenomeni emolitici acuti (106); possono invece essere presenti in quantità variabile precipitati e aggregati provenienti dalla denaturazione dell'Hb.

La rilevazione di varianti instabili dell'Hb mediante esami routinari eseguiti in automazione migliorerebbe la nostra capacità di riconoscere queste condizioni. A tale proposito sono stati documentati negli ultimi anni alcuni casi di emoglobinopatie instabili (107,108) che mostravano citogrammi leucocitari anomali con la citometria a flusso. Probabilmente, ma non ancora del tutto dimostrato, tali anomalie sono prodotte dal rilascio di emoglobina instabile durante la lisi dei globuli rossi

Tabella 6

Sintesi degli esami utili e dei riscontri nell'individuazione e caratterizzazione di varianti instabili

1° LIVELLO: caratteristiche eritrocitarie, emoglobiniche e biochimiche (a)

Indici eritrocitari:	
Eritrociti (RBC)	Normali/diminuiti
Emoglobina (Hb)	Generalmente ridotta
Ematocrito (HCT)	Normale/ridotto
Volume Cellulare Medio (MCV)	Non significativamente alterato in assenza di talassemie associate
Contenuto Cellulare Medio (MCH)	Normale/ridotto
Morfologia eritrocitaria	Normale o poco alterata, sferociti assenti, sporadica poichilocitosi

Assetto Hb:

Valutazione quali-quantitativa dell'HbA ₂	Normale nelle α e normale/aumentata nelle β instabili
Valutazione quali-quantitativa dell'HbF	Poco presente nell'adulto. Risulta rallentato lo switch nei neonati
Valutazione quali-quantitativa di varianti (HbX)	In molti casi HbX non evidenziate dai metodi separativi in uso

Indicatori di emolisi:

Reticolociti	Aumentati/normali
Aptoglobina	Fortemente diminuita
Bilirubina	Bilirubina indiretta aumentata
Lattato deidrogenasi	Aumentato

Assetto marziale:

Ferro	Normale/ aumentata
Ferritina	Normale/aumentata
Saturazione della transferrina	Normale/diminuita

LIVELLO Diagnostico Intermedio: conferme e caratterizzazione funzionale

Metodo separativo alternativo	2° esame di conferma in presenza o assenza di HbX
Test di falcizzazione	Negativo
Ricerca di inclusi eritrocitari (BCB Test) a 37 °C	Presenza di eritrociti con inclusi in numero variabile (b)
Test di termolabilità: instabilità "in vitro"	Positività variabile a 37 °C in isopropanolo, o con test a 50 °C
p50	Valore diminuito con alta affinità e aumentato con bassa affinità
Metaemoglobina (MetHb)	Valori superiori all'1% nel 15-20% delle varianti

Alcune caratteristiche generali

- Frequente presenza di urine con pigmento brunastro (dipiroli)
- Rari corpi di Heinz negli eritrociti periferici. Evidenti e consistenti in soggetti splenectomizzati
- Iperplasia eritroblastica a livello midollare
- MetHb sensibilmente aumentata dopo incubazione a 37 °C

2° LIVELLO Diagnostico: caratterizzazione molecolare del DNA o studio della catena globinica

- Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA): quando si sospetta la presenza di talassemie α o β da delezione associate ai difetti strutturali
- Sequenziamento (metodo Sanger): prevalentemente per la caratterizzazione di difetti talassemici e strutturali puntiformi dei geni globinici
- Next generation sequencing (NGS): procedura che consente di estendere lo studio anche ad altri geni non-globinici che possono condizionare l'espressione fenotipica delle varianti Hb
- Spettrometria di massa: quando è utile lo studio strutturale delle catene globiniche

a) I valori di riferimento, quando previsti, variano anche in base all'età dei pazienti;

b) La natura e le caratteristiche delle inclusioni eritrocitarie sono documentate in particolare alla voce 135 della Bibliografia.

nella camera di rilevazione della conta differenziale dei leucociti. Oltre a tali osservazioni, non esistono, ad oggi, strumentazioni che consentano di rivelare o quantificare in automazione e direttamente i prodotti della denaturazione dell'emoglobina instabile nell'eritrocita.

Assetti emoglobinici

Il laboratorio, nel percorso di 1° livello finalizzato prevalentemente alla prevenzione della β talassemia, è in grado di osservare e quantificare, in elettroforesi capillare (CE) o mediante High Performance Liquid

Chromatography (HPLC), molte varianti Hb tra cui quelle più frequenti come l'HbS, HbE, HbC (109,110). Come già detto, sono numerose le varianti instabili che non si riscontrano con tali metodi, (alcune sono riportate nelle Tabelle 1-4), a causa della denaturazione completa della globina immediatamente dopo la sintesi o, successivamente, per la precipitazione parziale o totale del tetramero emoglobinico. In generale, l'osservazione delle varianti mediante tali metodi separativi è condizionata dalle caratteristiche degli aa coinvolti nelle sostituzioni e dal pH utilizzato dai vari sistemi diagnostici, come accade peraltro anche con diverse

varianti non instabili. Tuttavia, quando le varianti instabili si separano dalle altre componenti emoglobiniche, presentano di solito una ridotta percentuale relativa che può far sospettare, già all'inizio del percorso diagnostico, la natura instabile della variante. Inoltre occorre tener presente che le varianti β instabili presentano, in alcuni casi, livelli moderatamente aumentati di HbA₂ (111), con un effetto compensativo a cui talvolta contribuisce anche l'HbF. Occorre aggiungere che talvolta possono essere evidenziate frazioni minori in posizioni riconducibili a componenti Hb degradate, oppure ossidate (metaemoglobina).

Indicatori di emolisi

I reticolociti, elementi cellulari che esprimono il passaggio dagli eritroblasti ai globuli rossi, vengono valutati percentualmente o in quantità assoluta per litro (i.r. nell'adulto: 50-110x10⁹/L; nel neonato: 110-240x10⁹/L). Il conteggio dei reticolociti rappresenta quindi un indice generico dell'attività midollare, in presenza di una anemia acuta o cronica, e dà la misura della risposta eritroide (112-114). Sia i metodi automatizzati che quelli manuali utilizzati per tale conteggio sfruttano la presenza endoeritrocitaria di materiale citoplasmatico che incorpora i coloranti sopravitali, come il nuovo blu di metilene o il blu brillante di cresile (BCB). Non vi sono evidenze per ritenere che alcuni dei parametri citometrici relativi ai reticolociti, disponibili con le strumentazioni oggi in uso, possano dare indicazioni utili nella differenziazione delle anemie emolitiche prodotte da varianti instabili dell'Hb, come invece appare per altre cause emolitiche (115,116). L'aptoglobina, la bilirubina indiretta e la lattato deidrogenasi sono indicatori sierici appropriati per la fase di differenziazione preliminare delle anemie (113,117,118) e la Tabella 6 riporta i comportamenti attesi in presenza di varianti instabili dell'Hb. I livelli di bilirubina indiretta potrebbero risultare significativamente più elevati in presenza di disordini del relativo metabolismo dovuti alla ridotta attività dell'isoenzima uridin-diphosphate-glucuronil-transferase 1A1 (UGT1A1) associato a mutazioni del gene omonimo (119-121). Tuttavia, mentre l'aumento della bilirubina è stato osservato in soggetti che, oltre a tale difetto, presentavano anemia emolitica dovuta a sferocitosi ereditaria o deficit di G6PD (122-125), non vi sono invece evidenze di aumento con le varianti instabili dell'Hb, fatto dovuto, probabilmente, solo alla mancanza di adeguati approfondimenti analitici molecolari nei casi con importanti iperbilirubinemie.

Assetto marziale

La valutazione del ferro, nel contesto degli esami per la definizione di una anemia emolitica, in particolare nell'ambito della diagnosi di varianti instabili, assume significato nella misura in cui i livelli di emoglobina risultano inferiori alla norma, così come accade per la diagnosi di β talassemia (126,127), ma anche per valutare un eventuale accumulo di ferro in seguito ad una emolisi cronica (128).

Livello diagnostico intermedio

Esami di conferma non specifica

Come raccomandato (127,129,130), l'analisi qualitativa delle componenti patologiche dell'emoglobina trova conferme e maggiori indicazioni mediante l'utilizzo di due diversi metodi: quello cromatografico e quello elettroforetico. Ciò vale, peraltro, anche nel caso delle varianti instabili, soprattutto quando il primo metodo in uso non ha prodotto evidenze nella separazione, oppure ha indicato frazioni poco risolte o componenti minori. Anche il test di falcizzazione deve essere preso in considerazione, dal momento che conosciamo varianti instabili che mostrano positività al test di "sickling" (105) con caratteristiche di migrazione e di eluizione anche diverse dall'HbS (131,132).

Esami specifici per l'osservazione *in vitro* dell'instabilità dell'emoglobina

L'ampia varietà di caratteristiche strutturali associate alle varianti instabili dell'Hb ha sempre reso difficile poter definire un "fenotipo instabile" mediante un unico esame *in vitro*. Il laboratorio ha a disposizione alcuni esami che consentono l'osservazione diretta dell'instabilità dell'Hb utilizzando sostanzialmente gli stessi effetti prodotti anche *in vivo* dal calore o dall'azione di sostanze ossidanti. Tali esami, a 50-55 °C (129) o a 37 °C con isopropanolo 17% (134), consentono di distinguere livelli diversi di instabilità indicati semiquantitativamente con +, ++, +++ (Tabella 5) e caratterizzati da torbidità o precipitazione variabilmente marcata, normalmente più evidente per le β -varianti. Nella Figura 2 è riportato il risultato positivo (+) dell'esame a 37 °C come si osserva più frequentemente nel caso di α -varianti instabili. I risultati degli esami per la determinazione dell'instabilità *in vitro* vengono valutati a tempi diversi di incubazione, ponendo a confronto campioni di normalità nota e trattati nelle stesse condizioni. Il prodotto della denaturazione dell'Hb e della conseguente precipitazione all'interno degli eritrociti, si può invece osservare utilizzando un colorante azoico, come il BCB, dopo incubazione per 30 – 120 minuti a 37 °C. Negli eritrociti di soggetti con Hb instabili, in tali condizioni, è possibile mettere in evidenza inclusi simili, ma in genere più grossolani, rispetto a quelli osservati in soggetti con HbH (Hb H-like). Tali inclusi sono particolarmente evidenti con le varianti β , meno con le α , e livelli di instabilità diversi si possono riconoscere in relazione al tempo di incubazione, al numero e alle dimensioni degli inclusi stessi (135). Va detto che la ricerca di inclusi endoeritrocitari rappresenta sempre un esame altrettanto utile e specifico nel percorso di riconoscimento di una emoglobinopatia instabile. Mediante colorazione *in vitro* con violetto di metile o con BCB, si possono riconoscere, nel sangue di soggetti portatori di varianti instabili, anche elementi endoeritrocitari denominati corpi di Heinz. Questi appaiono adesi alla membrana e sono costituiti da materiale Hb denaturato. In piccola quantità, tale materiale viene sempre fisiologicamente prodotto nei

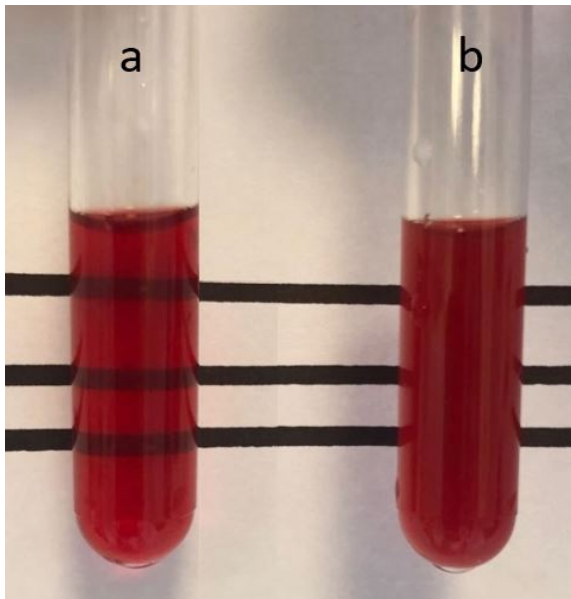


Figura 2
 Risultato del test per l'osservazione "in vitro" dell'instabilità dell'emoglobina a 37 °C con isopropanolo 17% (134): a) riscontro negativo (campione limpido) di un soggetto normale di controllo; b) riscontro positivo (campione torbido senza precipitati) di un soggetto portatore di Hb Torino.

soggetti normali, ma non risulta evidenziabile in quanto eliminato efficacemente dai processi emocateretici della milza. Tuttavia, quando la sopravvivenza eritrocitaria è ridotta, la maggior quantità di catene denaturate che precipitano rendono lo smaltimento meno efficace, per cui i corpi di Heinz, che contribuiscono pesantemente al danno eritrocitario e alla splenomegalia (136), risultano evidenti all'osservazione *in vitro*. Nel soggetto splenectomizzato portatore di Hb instabile, i corpi di Heinz appaiono particolarmente in evidenza, numerosi e grossolani.

Metaemoglobina e p50

La metaemoglobina (metHb) è la forma nella quale si presenta l'emoglobina quando il ferro nel gruppo eme passa dal normale stato ferroso (Fe^{2+}) allo stato ferrico (Fe^{3+}). In tale configurazione l'emoglobina non può legare l'ossigeno, producendo conseguentemente anemia funzionale e mancato rilascio di ossigeno ai tessuti. Un aumento significativo dei valori di metHb, oltre il normale livello del 2%, è una caratteristica tipica di rare forme di varianti Hb prodotte da mutazioni dei geni globinici α o β , noti come emoglobine M, ereditate con fenotipo autosomico dominante (137,138). I soggetti con livelli di metHb inferiori al 25% sull'emoglobina totale sono generalmente asintomatici, mentre quelli con valori superiori al 30% presentano cianosi (colorazione bluastra della pelle e delle mucose) e sintomi di ipossia (dispnea, cefalea, vertigini, alterazione dello stato mentale) progressivamente più marcati. Un aumento

della metHb oltre il 2%, e solitamente inferiore al 15%, accompagna sovente anche i soggetti con varianti instabili. Questo parametro, che viene misurato direttamente in emogasanalisi su sangue arterioso ed espresso come quota percentuale sul totale dell'emoglobina (139), può rappresentare un indice indiretto della presenza e delle caratteristiche di una anemia emolitica prodotta da una variante instabile dell'Hb (140) e costituisce un importante indice diagnostico in caso di ipossia. Occorre comunque sempre ricordare che la maggior parte delle cause di iper metHb esulano dalla presenza di emoglobinopatie (141,142).

L'affinità per l' O_2 è rappresentata dal parametro p50 e deriva dal calcolo di parametri rilevati in emogasanalisi: esprime la pressione parziale dell' O_2 (PaO_2) alla quale l'Hb è saturata al 50% e presenta valori di riferimento compresi nell'intervallo 24-28 mmHg (3,2-3,8 kPa) (139). Nel caso di varianti Hb si possono osservare valori di p50 variabilmente diminuiti con affinità aumentata e valori aumentati con affinità diminuita. Altre considerazioni sull'argomento sono già state riportate nel paragrafo "Varianti instabili e affinità per l'ossigeno".

2° Livello diagnostico

La caratterizzazione molecolare

Gli esami preliminari e quelli intermedi possono evidenziare o far sospettare la presenza di un difetto strutturale dell'Hb; tali esami possono dimostrare una instabilità strutturale, alterazioni ematologiche e funzionali. In molti casi però, come già detto, non vi sono le evidenze di difetti Hb, ma piuttosto fenotipi caratterizzati da anemia emolitica non definita o storie cliniche che prefigurano meccanismi di trasmissione dominanti o caratteristiche *de novo*. La caratterizzazione molecolare è sempre necessaria e auspicabile a completamento di un percorso di conoscenza utile al clinico.

Le varianti Hb studiate prima degli anni '80 venivano ben caratterizzate dal punto di vista biochimico e funzionale, ma molto meno per quanto riguardava la ricerca delle interazioni con difetti talassemici (143); ciò è avvenuto naturalmente per la scarsa evoluzione di strumenti adeguati e di sufficienti conoscenze relative all'indagine genetica molecolare. Oggi invece appare doveroso procedere alla caratterizzazione anche di composti o associazioni complesse, mediante lo studio del DNA, al fine di contribuire per quanto fattibile, alla conoscenza di possibili fattori attenuanti o aggravanti i fenotipi clinici osservati. Sporadicamente, inoltre, si può risalire alla composizione amminoacidica con tecniche di spettrometria di massa, come può accadere in situazioni molto rare e particolari come quelle prodotte da fenomeni di mosaicismo (144).

Il percorso diagnostico molecolare oggi prevede, ancora nella maggior parte dei casi, uno studio del DNA con sequenziamento secondo Sanger e con le tecniche

molecolari tradizionali, come indicato dalle raccomandazioni dedicate (127). Tuttavia l'approccio possibile e utile, già oggi e ancor più nel futuro prossimo, è quello con metodologie di sequenziamento di nuova generazione (Next generation sequencing, NGS) o sequenziamento in parallelo, con conseguente possibilità di allargare l'indagine a tutti i geni noti e potenzialmente coinvolti con i difetti globinici (Tabella 6), comprendendo anche quelli di più recente osservazione (145). In alcune circostanze può essere utile studiare l'intero esoma mediante *whole-exome sequencing* (WES), come è stato dimostrato in rari casi di anemia emolitica con fenotipi particolarmente atipici, riuscendo a rivelare la presenza di varianti dominanti instabili dell'Hb o di eventi *de novo* (146,147).

La previsione del fenotipo al servizio della consulenza genetica prenatale, alla nascita e nell'adulto

Le potenzialità dell'analisi molecolare consentono lo studio dei geni ad ogni età. In epoca fetale (148-150) si cercano, in particolare, i difetti potenzialmente causativi di condizioni marcate, in genere TDT, mentre nel soggetto adulto il laboratorio vive spesso l'esperienza di dover rispondere, con pochi elementi anamnestici a disposizione, a quesiti posti dal clinico per soggetti in cui si hanno o si sospettano genericamente difetti emoglobinici. Nella Tabella 7 è riportata una sintesi delle caratteristiche riconducibili alle varianti instabili con alcune considerazioni che potrebbero orientare gli esami, suggerendo percorsi diagnostici e quindi conclusioni di laboratorio più mirate. È evidente che nel caso di difetti rari, unici e nuovi il compito del laboratorio può essere arduo e quindi di frequente si procede per

analogia con varianti Hb già studiate con caratteristiche o riscontri analitici simili. Occorre ricordare che è rara la possibilità che si presentino le condizioni per sospettare lo stato omozigote per una Hb instabile. Meno rara è l'ipotesi che una variante instabile possa invece formare un composto con un difetto talassemico o si presenti associata ad altri fattori in grado di rendere più marcato il conseguente fenotipo. Tra i suddetti fattori ve ne sono alcuni che possono mostrare altrettanti fenomeni emolitici ed essere prevalenti nella popolazione, come il deficit di G6PD (151). L'eterogeneità fenotipica, più volte sottolineata, è tale che ogni variante instabile costituirà una condizione unica da valutarsi caso per caso. A tale scopo potranno essere trovati importanti riferimenti nella vasta letteratura prodotta nel tempo, nelle linee guida (127) e nei numerosi database dedicati (5,6,152-155).

Il laboratorio e la diagnosi delle varianti instabili alla nascita e nei primi mesi di vita

La ricerca delle cause che possono produrre una anemia emolitica nel neonato (entro i 28 giorni dalla nascita) o comunque nei primi mesi di vita può portare alla richiesta di esami per la ricerca di eventuali emoglobinopatie. In tale periodo della vita, una anemia prodotta da Hb instabili rappresenta una evenienza molto più rara rispetto ad altre possibili cause di emolisi (3,156). Tuttavia, molte varianti instabili delle catene β presentano un esordio precoce, in concomitanza con lo switch dell'HbF (157). Le raccomandazioni per la diagnostica alla nascita (158) fanno sovente riferimento alla difficile interpretazione dei risultati dei test globinici, a causa soprattutto della presenza di elevate quantità di HbF e dei cambiamenti continui, non sempre uniformi, che caratterizzano proprio lo switch HbF \rightarrow HbA (159).

Tabella 7

Sintesi delle caratteristiche e delle opzioni che il laboratorio deve considerare nell'affrontare lo studio dei difetti associati alle emoglobine instabili

Caratteristiche generali

- Producono anemie di grado diverso e con modalità variabili
- Possono presentarsi come difetti *de novo*
- Si trasmettono con un meccanismo dominante o recessivo
- Talvolta producono fenotipi simil-talassemici
- L'esordio prevalente è nella prima infanzia ma dipende dai geni globinici coinvolti
- Con difetti talassemici esprimono fenotipi variabili ma sempre significativamente marcati
- Presentano corpi di Heinz evidenti soprattutto dopo splenectomia
- Gli inclusi Hb H-like prodotti *in vitro* si presentano con caratteristiche qualitative e quantitative molto variabili
- Sovente presentano alterata affinità per l'O₂
- Esprimono fenotipi diversi in relazione ai geni globinici coinvolti
- Non sono prevalenti o caratteristici in aree geografiche o etnie particolari
- Sono considerate "difetti rari" ma sovente non vengono riconosciute e risultano sottovalutate
- Possono presentare quadri clinici tali da suggerire la splenectomia che tuttavia deve essere valutata con attenzione e prudenza

Approccio allo studio e alla diagnosi di laboratorio

- Importante conoscere la storia clinica del paziente prima di iniziare il percorso di laboratorio
- Necessario discriminare le diverse cause dell'emolisi con test dedicati
- I test dedicati per le Hb instabili in genere non sono automatizzati e standardizzati
- In molti casi i test separativi per l'Hb non consentono di evidenziare la presenza delle varianti instabili
- I test funzionali devono essere eseguiti in accordo con le indagini strutturali
- L'esame molecolare è sempre necessario

Fino ai primi 3 mesi, la quantità relativa di catene β è sensibilmente più bassa rispetto alle catene α e γ prodotte e quindi l'eventuale denaturazione delle poche catene β instabili non è in grado di produrre segni clinici particolarmente significativi. I test specifici per la determinazione *in vitro* dell'instabilità sono scarsamente utilizzabili quando l'HbF è presente in quantità superiore al 10%. L'HbF potrebbe infatti esaltare o mimare la positività dei test con evidenze falsamente positive e rendere quindi difficile accertare o escludere la presenza di una emoglobinopatia. È quindi importante che il laboratorio valuti con attenzione l'appropriatezza degli esami richiesti e la consistenza dei risultati quando è evidente che lo switch dell'HbF non è giunto a naturale completamento. I valori alterati degli indicatori di emolisi e/o della metHb e/o della bilirubina possono essere associati ad uno stato emolitico, nel neonato come nell'adulto, ma non specificatamente all'eventuale effetto prodotto da una emoglobinopatia instabile.

Statisticamente, nei primi mesi di vita vengono richiesti con maggior frequenza al laboratorio gli esami di approfondimento conseguenti all'osservazione di uno stato anemico o di una marcata iperbilirubinemia (prevalentemente di tipo indiretto). Per una corretta valutazione di tale aumento di bilirubina, per la sua elevata frequenza e per la varietà di fattori ereditari, anche riconducibili alle emoglobinopatie che possono generarla, si rendono indispensabili approfondimenti per evitare tra l'altro una generica classificazione di "ittero idiopatico" (160-162).

I metodi separativi per la definizione dell'assetto Hb hanno sempre un ruolo importante nell'individuare la presenza di varianti e, come già detto a proposito di tali esami nei soggetti adulti, sono molti i difetti strutturali dei geni globinici che anche nel neonato non si rendono visibili. Tuttavia nei primi mesi di vita potrebbero essere osservate varianti γ , ovvero HbF-X ($\alpha_2\gamma_2^x$), non visibili nell'adulto e che, quando sono instabili, producono anch'esse fenomeni emolitici (163-165). Anche varianti α instabili possono essere osservate nei primi mesi, quelle stesse che possono essere rilevate in età adulta. Tali varianti HbX ($\alpha_2^x\beta_2$) sono presenti in piccola quantità, mentre l'HbFX ($\alpha_2^x\gamma_2$) che si forma con le catene mutate α^x viene separata in quantità significativamente maggiore.

Alla luce di tali considerazioni si deve ribadire che i quesiti inviati al laboratorio, soprattutto per la ricerca di eventuali varianti instabili dell'emoglobina, devono essere sempre supportati da notizie cliniche relative al paziente e alla sua famiglia. L'esperienza di laboratorio insegna che in molti casi è necessario procedere con esami di 2° livello (166), i quali peraltro, in base alla valutazione clinica, possono essere differiti o subordinati alla ripetizione degli esami biochimici e dell'assetto Hb al completamento dello switch dell'HbF.

CONCLUSIONI

In questa rassegna si è inizialmente dedicato spazio ai numerosi cambiamenti strutturali che danno origine

alle emoglobine instabili e quindi ai fenotipi associati. Nella seconda parte sono stati esaminati diversi metodi analitici per l'individuazione e la caratterizzazione di questi difetti instabili dell'emoglobina, sovente poco considerati anche dai laboratori che si occupano di emoglobinopatie. Il modello di trasmissione autosomica dominante che caratterizza gran parte delle emoglobine instabili comporta che i difetti ad esse associati siano in grado di produrre anemie emolitiche anche allo stato eterozigote. Occorre osservare che le emoglobinopatie instabili, caratterizzate da una eterogeneità di fenotipi clinici e di quadri ematologici ed emoglobinici, risultano sovente sotto-diagnosticate o non correttamente valutate nell'ambito delle consulenze genetiche. Oggi, che tutto sembra indirizzare velocemente verso l'analisi molecolare, deve essere ribadita l'importanza di poter risalire alle caratteristiche funzionali e alla definizione della stabilità della struttura globinica quando, dopo aver eseguito gli esami di 1° livello si sospetta la presenza di una emoglobina instabile. Queste sono le prime e urgenti risposte che il laboratorio è chiamato a produrre al clinico, sovente in un'ottica differenziale, per la prevenzione e la gestione di una anemia emolitica. Tuttavia, gli strumenti diagnostici molecolari disponibili allo stato attuale, e ancor più quelli del futuro, nonché l'utilizzo di moderni database, ci potranno aiutare a svelare anche nuovi difetti strutturali e interazioni con altri geni, con l'obiettivo di contribuire sempre più e meglio alla prevenzione, alla gestione delle consulenze genetiche dedicate e alla cura di questi difetti rari (150-153,167,168).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Haley K. Congenital Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am* 2017;101:361-74.
- Guillaud C, Loustau V, Michel M. Hemolytic anemia in adults: main causes and diagnostic procedures. *Expert Rev Hematol* 2012;5:229-41.
- Manzato F, Franchini M, Vescovi PP. Emolisi in vivo. Parte I: classificazione. *Biochim Clin* 2014;38:92-102.
- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. *Disorders of Hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*, 2nd ed. New York (NY, USA): Cambridge University Press, 2009.
- HbVar database for human hemoglobin variants and thalassemia mutations. <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html> bx.psu.edu (ultimo accesso: ottobre 2021).
- ITHANET Portal (www.ithanet.eu) (ultimo accesso: ottobre 2021).
- Sansone G, Carrell R, Lehmann H. Haemoglobin Genova: $\beta 28$ (B10) Leucine→Proline. *Nature* 1967;214:877-9.
- Beretta A, Prato V, Gallo E, et al. Haemoglobin Torino - $\alpha 43$ (CDI) Phenylalanine→Valine. *Nature* 1968;217:1016-8.
- Ivaldi G, David O, Baffico M, et al. Hb Trento: an elongated C-terminal beta chain due to a new frameshift mutation [β 144 (-A)]. *Hemoglobin* 2003;27:15-25.
- Perutz MF, Kendrew JC, Watson HC. Structure and function of hemoglobin. II. Some relations between

- polypeptide chain configuration and amino-acid sequence. *J Mol Biol* 1965;13:669-78.
11. Huisman THJ, Schroeder WA. New aspects of the structure, function and synthesis of haemoglobins. CRC Monoscience Series Butterworth & Co Publishers Ltd, 1971.
 12. Perutz MF, Muirhead H, Cox JM, et al. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. *Nature* 1968;219:131-9.
 13. Hrkál Z, Vadrázka Z. A study of the conformation of human globin in solution by optical methods. *Biochim Biophys Acta* 1967;133:527-34.
 14. Liebhaber SA, Kan YM. Differentiation of the mRNA transcripts origination from alpha1- and alpha2 globin loci in normals and alpha-thalassemics. *J Clin Invest* 1981;68:439-46.
 15. Rosemeyer MA, Huens ER. On the mechanism of the dissociation of haemoglobin. *J Mol Biol* 1967;25:253-73.
 16. Griffon N, Baudin V, Dieryck W, et al. Tetramer-dimer equilibrium of oxyhemoglobin mutants determined from auto-oxidation rates. *Protein Science* 1998;7:673-80.
 17. Carrell RW, Lehmann H, Lorkin PA, et al. Haemoglobin Sydney: Beta-67 (E11) valine modified to alanine: an emerging pattern of unstable haemoglobins. *Nature* 1967;215:626-8.
 18. Ohba Y. Unstable hemoglobins. *Hemoglobin* 1990;14:353-88.
 19. Zinkham WH, Houtchens RA, Caughey WS. Relation between variations in the phenotypic expression of an unstable hemoglobin disorder (hemoglobin Zürich) and carboxyhemoglobin levels. *Am J Med* 1983;74:23-9.
 20. Aguinaga MP, Wright CJ, Roa PD, et al. Molecular diagnosis and characterization of Hb Zürich [beta63(E7)His>Arg] carriers in a Kentucky family. *Hemoglobin* 1998;22:509-15.
 21. Josephson AM, Weinstein HG, Yakulis VJ, et al. A new variant of hemoglobin M disease: hemoglobin M-Chicago. *J Lab Clin Med* 1962;59:918-25.
 22. Ranney HM, Jacobs AS, Udem L, et al. Hemoglobin Riverdale-Bronx an unstable hemoglobin resulting from the substitution of arginine for glycine at helical residue B6 of the B beta polypeptide chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1968;33:1004-5.
 23. Lorkin PA, Pietschmann H, Braunsteiner H, et al. Structure of haemoglobin Wien beta 130 (H8) tyrosine-aspartic acid: an unstable haemoglobin variant. *Acta Haematol* 1974;51:351-61.
 24. McDonald MJ, Michalski LA, Turci SM, et al. Structural, functional, and subunit assembly properties of hemoglobin Attleboro [alpha 138 (H21) Ser>Pro], a variant possessing a site maturation at a critical C-terminal residue. *Biochemistry* 1990;29:173-8.
 25. Quattieri A, Andreoli V, Crescibene L, et al. Hb Valletta [beta 87 (F3)Thr>Pro] due to an A→C substitution at codon 87 in a Calabrian family with alpha-thalassemia. *Hemoglobin* 1997;21:97-103.
 26. Lokich JJ, Moloney WC, Bunn HF, et al. Hemoglobin Brigham (alpha2Abeta2100 Pro→Leu). Hemoglobin variant associated with familial erythrocytosis. *J Clin Invest* 1973;52:2060-7.
 27. Asakura T, Adachi K, Wiley JS, et al. Structure and function of haemoglobin Philly (Tyr C1 (35) beta replaced by Phe). *J Mol Biol* 1976;104:185-95.
 28. Dacie JV, Shinton NK, Gaffney PJ Jr, et al. Haemoglobin Hammersmith (beta-42 (CD1) Phe replaced by ser). *Nature* 1967;216:663-5.
 29. Keeling MM, Ogden LL, Wrightstone RN, et al. Hemoglobin Louisville (beta-42 (CD1) phe-leu): an unstable variant causing mild hemolytic anemia. *J Clin Invest* 1971;50:2395-402.
 30. Zhao W, Wilson JB, Huisman TH. Low quantities of Hb Boyle Heights or alpha 2(6)(A4)Asp→0 beta 2 observed in three members of a Caucasian family. *Hemoglobin* 1990;14:637-40.
 31. De Jong WW, Went LN, Bernini LF. Haemoglobin Leiden: deletion of beta-6 or 7 glutamic acid. *Nature* 1968;220:788-90.
 32. Jones RT, Brimhall B, Huisman TH, et al. Hemoglobin Freiburg: abnormal hemoglobin due to deletion of a single amino acid residue. *Science* 1966;154:1024-7.
 33. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable hemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.
 34. de Castro CM, Devlin B, Fleener DE, et al. A novel beta-globin mutation, beta Durham-NC [beta 114 Leu>Pro], produces a dominant thalassemia-like phenotype. *Blood* 1994;83:1109-16.
 35. Efremov GD, Wrightstone RN, Huisman TH, et al. An unusual hemoglobin anomaly and its relation to alpha-thalassemia and hemoglobin-H disease. *J Clin Invest* 1971;50:1628-36.
 36. De Jong WW, Meera Khan P, Bernini LF. Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. *Am J Hum Genet* 1975;27:81-90.
 37. Liebhaber SA, Kan YW. Alpha-Thalassemia caused by an unstable alpha-globin mutant. *J Clin Invest* 1983;71:461-6.
 38. Favero ME, Ferreira Costa F. Alpha-Hemoglobin-Stabilizing protein: an erythroid molecular chaperone. *Biochem Res Int* 2011;373859.
 39. Lai MI, Jiang J, Silver N, et al. α-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of β-thalassaemia. *Br J Haematol* 2006;133:675-82.
 40. Feng L, Gell DA, Zhou S, et al. Molecular mechanism of AHPSP-mediated stabilization of α-hemoglobin. *Cell* 2004;119:629-40.
 41. Barberio G, Ivaldi G. Le catene alfa-globiniche libere e il gene AHSP. In: Emoglobinopatie dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Padova: Piccin Editore, 2020:62-4.
 42. Codrington JF, Kutlar F, Harris HF, et al. Hb A2-Wrens or alpha 2 delta 2 98(FG5) Val→Met, an unstable delta chain variant identified by sequence analysis of amplified DNA. *Biochim Biophys Acta* 1989;1009:87-9.
 43. Barberio G, Moggi M, Maffei M, et al. Appropriata valutazione dell'HbA2 nella prevenzione dei difetti talassemici: il caso dell'HbA2-Sile δ3 (NA3) Leu→Pro [HBD:c.11T>C; p.Leu4Pro]. *Atti 4° Congresso Nazionale SIPMel*, 2018.
 44. Bento C, Magalhães Maia T, Carvalhais I, et al. Transient neonatal cyanosis associated with a new Hb F variant: Hb F viseu. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:e77-80.
 45. Crowley MA, Mollan TL, Abdulmalik OY, et al. A hemoglobin variant associated with neonatal cyanosis and anemia. *N Engl J Med* 2011;364:1837-43.
 46. Pirastru M, Mereu P, Trova S, et al. Hb F-Avellino [(G)γ41(C7)Phe→Leu; HBG2: c.124 T>C]: A New Hemoglobin Variant Observed In A Healthy Newborn. *Hemoglobin* 2016;40:61-3.
 47. Pirastru M, Mereu P, Trova S, et al. A new unstable variant of the fetal hemoglobin HBG2 gene: Hb F-Turritana [(G)γ64(E8)Gly→Asp, HBG2:c.194G>A] found in cis to the Hb F-Sardinia gene [(A)γ(E19)Ile→Thr, HBG1:c.227T>C]. *Eur J Haematol* 2014;92:510-3.
 48. Wajzman H, Galactéros F. Hemoglobins with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts. *Hemoglobin* 2005;29:91-106.
 49. Huehns ER, Hecht F, Yoshida A, et al. Hemoglobin-Seattle

- (alpha-2 beta-2 76-Glu): an unstable hemoglobin causing chronic hemolytic anemia. *Blood* 1970;36:209-18.
50. De Furia FG, Miller DR. Oxygen affinity in hemoglobin Köln disease. *Blood* 1972;39:398-406.
 51. Aguinaga MP, Wright CJ, Roa PD, et al. Molecular diagnosis and characterization of Hb Zürich [beta63(E7)His→Arg] carriers in a Kentucky family. *Hemoglobin* 1998;22:509-15.
 52. White JM, Brain MC, Lorkin PA, et al. Mild "unstable haemoglobin haemolytic anaemia" caused by haemoglobin Shepherds Bush(B74(E18) Gly→Asp). *Nature* 1970;225:939-41.
 53. Wajcman H, Galactéros F. Hemoglobins with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts. *Hemoglobin* 2005;29:91-106.
 54. David O, Ivaldi G, Rabino-Massa E, et al. Functional studies on nine different haemoglobins with high oxygen affinity. *Acta Haematol* 2002;108:132-8.
 55. Bellingham AJ, Huehns ER. Compensation in haemolytic anaemias caused by abnormal haemoglobins. *Nature* 1968;218:924-6.
 56. Prato V, Gallo E, Ricco G, et al. Haemolytic anaemia due to haemoglobin Torino. *Br J Haematol* 1970;19:105-15.
 57. Bruns CM, Thet LA, Woodson RD, et al. Hemoglobinopathy case finding by pulse oximetry. *Am J Hematol* 2003;74:14-3.
 58. Verhovsek M, Henderson MPA, Cox G, et al. Erratum to: unexpectedly low pulse oximetry measurements associated with variant hemoglobins: a systematic review. *Am J Hematol* 2010;85:822-5.
 59. Deyell R, Jackson S, Spier S, et al. Low oxygen saturation by pulse oximetry may be associated with a low oxygen affinity hemoglobin variant, Hemoglobin Titusville, JPediatr Hematol Oncol 2006;28:100-2.
 60. Srivastava P, Kaeda JS, Roper D, et al. Severe hemolytic anemia associated with the homozygous state for an unstable hemoglobin variant (Hb Bushwick). *Blood* 1995;86:1977-82.
 61. Kai Huang, Shijun Ge, Wei Yi, et al. Interactions of unstable hemoglobin Rush with thalassemia and hemoglobin E result in thalassemia intermedia. *Hematology* 2019;24:459-66.
 62. Badens C, Paolasso C, Fossat C, et al. Compound heterozygosity for unstable hemoglobin Genova and beta(o)-thalassemia associated with early onset of thalassemia major syndrome. *Haematologica* 2005;90:ECR04.
 63. Ranney HM, Sharma VS, Noble RW. Unstable hemoglobins and thalassemia: some properties of Hb Köln. *Ann N Y Acad Sci* 1974;232:293-6.
 64. Efremov GD. Dominantly inherited beta-thalassemia. *Hemoglobin* 2007;31:193-207.
 65. Wajcman H, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, et al. Unstable and thalassaemic alpha chain hemoglobin variants: a cause of Hb H disease and thalassemia intermedia. *Hemoglobin* 2008;32:327-49.
 66. Frischer H, Bowman J. Hemoglobin E. An oxidatively unstable mutation. *J Lab Clin Med* 1975;85:531-9.
 67. Rees DC, Clegg JB, Weatherall DJ. Is hemoglobin instability important in the interaction between hemoglobin E and β thalassemia? *Blood* 1998;92:2141-6.
 68. Orkin SH, Kazazian HH, Antonarakis SE, et al. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of β E-globin gene. *Nature* 1982;300:768-9.
 69. Traeger J, Wood WG, Clegg JB, et al. Defective synthesis of Hb E is due to reduced levels of β E mRNA. *Nature* 1980;288:497-9.
 70. Fucharoen S, Weatherall DJ. The hemoglobin E thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a011734.
 71. Ekwattanakit S, Riouueang S, Viprakasit V. Interaction between Hb E and Hb Yala (HBB:c.129delT); a novel frameshift beta globin gene mutation, resulting in Hemoglobin E/ β 0 thalassemia. *Hematology* 2018;23:117-21.
 72. Halbrecht I, Isaacs WA, Lehmann H, et al. Hemoglobin Hasharon (alpha 47 aspartic acid→histidine). *Isr J Med Sci* 1967;3:827-31.
 73. Ostertag W, Smith EW. Hb Sinai, a new alpha chain mutant alpha his 47. *Humangenetik* 1968;6:377-9.
 74. Charache S, Mondzac AM, Gessner U. Hemoglobin Hasharon (alpha-2-47 his(CD5)beta-2): a hemoglobin found in low concentration. *J Clin Invest* 1969;48:834-47.
 75. Mavilio F, Marinucci M, Massa A, et al. Hemoglobin Hasharon [alpha 247 (CD5)Asp leads to His beta 2] linked to alpha-thalassemia in northern Italian carriers. Hematological and biosynthetic studies. *Acta Haematol* 1980;63:305-11.
 76. Bender JW, Reilly MP, Asakura T. Molecular stability and function of hemoglobins Hasharon (alpha(2)47 (CD5)Asp→His beta 2) and Hasharon (alpha(2)47 (CD5)Asp→His delta 2). *Hemoglobin* 1984;8:61-73.
 77. Adams JG, Heller P, Abramson RK, et al. Sulfonamide-induced hemolytic anemia and hemoglobin Hasharon. *Arch Intern Med* 1977;137:1449-51.
 78. Molchanova TP, Pobedimskaya DD, Huisman TH. The differences in quantities of alpha 2- and alpha 1-globin gene variants in heterozygotes. *Br J Haematol* 1994;88:300-6.
 79. Giglioni B, Comi P, Taramelli R, et al. Organization of alpha-globin genes in Hb Hasharon (alpha 47 asp replaced by his) carriers. *Blood* 1980;56:1145-9.
 80. Pich P, Saglio G, Camaschella C, et al. Interaction between Hb Hasharon and alpha-thalassemia: an approach to the problem of the number of human alpha loci. *Blood* 1978;51:339-46.
 81. Levine RL, Lincoln DR, Buchholz WM, et al. Hemoglobin Hasharon in a premature infant with hemolytic anemia. *Pediatr Res* 1975;9:7-11.
 82. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001.
 83. Hartevelde, CL, Higgs, DR α -thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:13.
 84. Fucharoen S, Winichagoon P, Pootrakul P, et al. Differences between two types of Hb H disease, alpha-thalassemia 1/alpha-thalassemia 2 and alpha-thalassemia 1/Hb Constant Spring. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1987;23:309-15.
 85. WHO. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. 2011. http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011. (ultimo accesso: ottobre 2021)
 86. Jandrić Balen M, Lukenda V, Jandrić I, et al. HbA1C - overall glycemia marker and hemolytic anemia indicator. *Med Glas (Zenica)* 2012;9:406-8.
 87. Debar A, Charmion S, Ben Ameer S, et al. Inappropriate low glycated hemoglobin and hemolysis. *Rev Med Internet* 2009;30:525-7.
 88. Finan E, Joseph J. Glycosylated haemoglobin: a false sense of security. *BMJ Case Rep* 2018;11:e227668.
 89. Aggarwal N, Rai AK, Kupfer Y, et al. Immeasurable glycosylated haemoglobin: a marker for severe haemolysis. *BMJ Case Reports* 2013;2013:bcr2013200307.
 90. Hain RD, Chitayat D, Cooper R, et al. Hb FM-Fort Ripley: confirmation of autosomal dominant inheritance and diagnosis by PCR and direct nucleotide sequencing. *Hum Mutat* 1994;3:239-42.
 91. Veltman J, Brunner H. De novo mutations in human

- genetic disease. *Nat Rev Genet* 2012;13:565-75.
92. Carrell RW, Winterbourn CC. The unstable hemoglobins. *Tex Rep Biol Med* 1980-1981;40:431-45.
 93. Stamatoyannopoulos G, Nute PE, Miller M. De novo mutations producing unstable Hbs of Hbs M. I. Establishment of a depository and use of data to test for an association of de novo mutation with advanced parental age. *Hum Genet* 1981;58:396-404.
 94. Stamatoyannopoulos G, Nute, P.E. De novo mutations producing unstable Hbs or Hbs M. *Hum Genet* 1982;60:181-8.
 95. Wallace WJ, Volpe JA, Maxwell JC, et al. Properties of hemoglobin A and hemoglobin Zurich (beta63 histidine replaced by arginine): quantitative evaluation of functional abnormalities in hemoglobins. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;68:1379-86.
 96. Hill QA, Farrar L, Lordan J, et al. A combination of two novel alpha globin variants Hb Bridlington (HBA1) and Hb Taybe (HBA2) resulting in severe hemolysis, pulmonary hypertension, and death. *Hematology* 2015;20:50-2.
 97. Lode HN, Krings G, Schulze-Neick I, et al. Pulmonary hypertension in a case of Hb-Mainz hemolytic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:173-7.
 98. Thuret I, Bardakdjian J, Badens C, et al. Priapism following splenectomy in an unstable hemoglobin: hemoglobin Olmsted beta 141 (H19) Leu→Arg. *Am J Hematol* 1996;51:133-6.
 99. Kim BJ, Park KW, Koh SB, et al. Stroke induced by splenectomy in hemoglobin Madrid: autopsy clues to the underlying mechanism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:141-4.
 100. Iolascon A, Andolfo I, Barcellini W, et al. Working Study Group on red cells and iron of the EHA. Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias. *Haematologica* 2017;102:1304-13.
 101. Bain BJ. Laboratory techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis. In: *Haemoglobinopathy Diagnosis* (3rd ed). John Wiley & Sons Ltd; 2020:30-84.
 102. Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev* 2006;27:27-38.
 103. Thein SL. Genetic basis and genetic modifiers of beta-thalassemia and sickle cell disease. *Adv Exp Med Biol* 2017;1013:27-57.
 104. Shefer Averbuch N, Steinberg-Shemer O, Dgany O, et al. Targeted next generation sequencing for the diagnosis of patients with rare congenital anemias. *Eur J Haematol* 2018;101:297-304.
 105. Old J, Hartevelde CL, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders: Volume 2: Laboratory Protocols [Internet]. 2nd edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2012.
 106. Williamson D. The unstable haemoglobins. *Blood Rev* 1993;7:146-63.
 107. M. Rosetti, G. Poletti, A. Sensi, et al. A rare case of hemoglobin Leiden interfering with the DIFF channel of Sysmex XE-2100. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:436-7.
 108. Mongelli F, Barberio G, Ivaldi G. A rare and unstable hemoglobin variant, Hb M Dothan β 25/26 (-GTG), detected by the anomalous cytogram on Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:e31-3.
 109. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M, et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol* 2009;31:484-95.
 110. Degandt S, Coens R, Cauwelier B, et al. Evaluation of four hemoglobin separation analyzers for hemoglobinopathy diagnosis. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22224.
 111. Ivaldi G, Barberio G, Hartevelde C, et al. HbA2 measurements in beta-thalassemia and in other conditions. *Thalassemia Rep* 2014;4:45-8.
 112. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, et al. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med* 2015;35:133-63.
 113. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical applications of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia. *Dis Markers* 2015;2015:635670.
 114. Jamwal M, Sharma P, Das R. Laboratory approach to hemolytic anemia. *Indian J Pediatr* 2020;87:66-74.
 115. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. General haematology task force of the British committee for standards in H. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update. *Br J Haematol* 2012;156:37-49.
 116. Roper D, Layton M. Investigation of the hereditary hemolytic anemias: membrane and enzyme abnormalities. 11th ed. In: Bain BJ LM BI, Lewis SM, editors. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier 2012:245-54.
 117. Manzato F, Franchini M, Vescovi PP. Emolisi in vivo. Parte II: algoritmi diagnostici. *Biochim Clin* 2014;38:284-91.
 118. Graziani MS, Caldini A, Basile U, et al. Indicazioni per la misura delle principali proteine sieriche. *Biochim Clin* 2012;36:244-67.
 119. Steventon G. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1. *Xenobiotica* 2020;50:64-76.
 120. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001;344:581-90.
 121. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, et al. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr* 2012;171:11-5.
 122. Lee JH, Moon KR. Coexistence of Gilbert syndrome and hereditary spherocytosis in a child presenting with extreme jaundice. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2014;17:266-9.
 123. Butorac Ahel I, Baraba Dekanic K, Palcevski G, et al. An infant with unusually high unconjugated hyperbilirubinemia due to coexistence of hereditary spherocytosis and Gilbert syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40:e127-8.
 124. Kumar D, Parakh A, Sharma S. Gilbert syndrome increasing unconjugated hyperbilirubinemia in a child with hereditary spherocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012;34:54-6.
 125. Galanello R, Cipollina M, Carboni G, et al. Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome. *Eur J Pediatr* 1999;158:914-6.
 126. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010;149:35-49.
 127. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2015;23:426-37.
 128. Fibach E, Rachmilewitz EA. Iron overload in hematological disorders. *Presse Med* 2017;46:e296-e305.
 129. Raccomandazioni per la diagnostica di primo livello delle emoglobinopatie-SITE 2012 http://www.site-italia.org/collana_scientifica.php. (ultimo accesso ottobre 2021).
 130. Kutlar F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin* 2007;31:243-50.
 131. Felio-Torres A, Eberle SE, Bragós IM, et al. Hb S-San Martin: a new sickling hemoglobin with two amino acid substitutions [β 6(A3)Glu→Val; β 105(G7)Leu→Pro] in an Argentinean family. *Hemoglobin* 2010;34:500-4.
 132. Moo-Penn WF, Schmidt RM, Jue DL, et al. Hemoglobin S

- Travis: a sickling hemoglobin with two amino acid substitutions [beta6(A3) glutamic acid leads to valine and beta142 (H20) alanine leads to valine]. *Eur J Biochem* 1977;77:561-6.
133. Dacie JC, Lewis SM. *Practica Hematology*, 5th edn. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone, 1975:227-33.
 134. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.
 135. Sansone G, Sciaratta GV, Ivaldi G, et al. Hb H-like in red cells of patients with unstable haemoglobin. *Haematologica* 1987;72:481-6.
 136. Winterbourn CC, Carrell RW. Studies of hemoglobin denaturation and Heinz body formation in the unstable hemoglobins. *J Clin Invest* 1974;54:678-89.
 137. Kumar GV, Sharma P, Chhabra S, et al. Hb M-Iwate in an Indian family. *Clin Chim Acta* 2015;446:192-4.
 138. Gerald PS, Efron ML. Chemical studies of several varieties of Hb M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1758-67.
 139. Pezzati P, Tronchin M, Messeri G. Emogasanalisi. *Biochim Clin* 2004;28:532-41.
 140. Hojas-Bernal R, McNab-Martin P, Fairbanks VF, et al. Hb Chile [β 28(B10)Leu \rightarrow Met]: An unstable hemoglobin associated with chronic methemoglobinemia and sulfonamide or methylene blue-induced hemolytic anemia. *Hemoglobin* 1999;23:125-34.
 141. Agarwal AM, Prchal JT. Methemoglobinemia and other dyshemoglobinemias. In: Williams Hematology, 9th ed, Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, et al (Eds). New York: McGraw-Hill Education, 2015:789.
 142. Ashurst J, Wasson M. Methemoglobinemia: a systematic review of the pathophysiology, detection, and treatment. *Del Med J* 2011;83:203-8.
 143. Ricco G, Scaroina F, Burzio P, et al. Functional properties of the unstable Hb-Torino: alpha 43 (CD-1) Phe-Val. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1985;61:619-26.
 144. Iacomelli I, Barberio G, Pucci P, et al. Hemoglobin Yamagata [β 132(H10)Lys \rightarrow Asn; (HBB: c.399A>T)]: a mosaic to be put together. *Clin Chem Lab Med* 2021 23;59:1670-9.
 145. Achour A, Koopmann T, Castel R, et al. A new gene associated with a b-thalassemia phenotype: The observation of variants in SUPT5H. *Blood* 2020;136:1789-93.
 146. Rizzuto V, Koopmann TT, Blanco-Álvarez A, et al. Usefulness of NGS for diagnosis of dominant beta-thalassemia and unstable hemoglobinopathies in five clinical cases. *Front Physiol* 2021;12:628236.
 147. Katsantoni E. Omics studies in hemoglobinopathies. *Mol Diagn Ther* 2019;23:223-34.
 148. Damiani G, Vinciguerra M, Jakil C, et al. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies: from fetoscopy to coelocentesis. *Thal Rep* 2014;4:67-77.
 149. Hooven TA, Hooper EM, Wontakal SN, et al. Diagnosis of a rare fetal haemoglobinopathy in the age of next-generation sequencing. *BMJ Case Reports* 2016;bcr2016215193.
 150. Vrettou C, Kakourou G, Mamas T, et al. Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. *Int J Lab Hematol* 2018;40:74-82.x
 151. Deng Z, Yang F, Bai Y, et al. Co-inheritance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations and hemoglobin E in a Kachin population in a malaria-endemic region of Southeast Asia. *PLoS One* 2017;12:e0177917.
 152. Adzhubei A, Schimdt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248-9.
 153. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11:361-2.
 154. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research* 2011;39:e118.
 155. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2013;42:D980-5.
 156. Phillips J, Henderson AC. Hemolytic anemia: evaluation and differential diagnosis. *Am Fam Physician* 2018;98:354-61.
 157. Yates AM, Mortier NA, Hyde KS, et al. The diagnostic dilemma of congenital unstable hemoglobinopathies. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:1393-5.
 158. Ivaldi G, Barberio G, Caruso V, et al. Raccomandazioni per la diagnosi neonatale delle emoglobinopatie. *Biochim Clin* 2015;39:116-34.
 159. Wood WG. Haemoglobin synthesis during human fetal development. *Br Med Bull* 1976;32:282-7.
 160. Christensen RD, Nussenzweig RH, Yaish HM, et al. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. *J Perinatol* 2014;34:616-9.
 161. Cortesi V, Manzoni F, Raffaelli G, et al. Severe presentation of congenital hemolytic anemias in the neonatal age: diagnostic and therapeutic issues. *Diagnostics (Basel)* 2021;11:1549.
 162. Bhutani VK, Maisels MJ, Schutzman DL, et al. Identification of risk for neonatal haemolysis. *Acta Paediatr* 2018;107:1350-6.
 163. Bento C, Magalhães Maia T, Carvalhais I, et al. Transient Neonatal Cyanosis Associated With a New Hb F Variant: Hb F Viseu. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:e77-80.
 164. Ghotra S, Jangaard K, Pambrun C, et al. Congenital methemoglobinemia due to Hb F-M-Fort Ripley in a preterm newborn. *BMJ Case Rep* 2016; 2016:bcr2016214381.
 165. Dainer E, Shell R, Miller R, et al. Neonatal cyanosis due to a novel fetal hemoglobin: Hb F-Circleville [Ggamma63 (E7)His \rightarrow Leu, CAT>CTT]. *Hemoglobin* 2008;32:596-600.
 166. Kumar MK, Judd C, Hoyer JD, et al. Hb Manukau [β 67(E11)Val \rightarrow Gly; HBB: c.203T>G]: the role of genetic testing in the diagnosis of idiopathic hemolytic anemia. *Hemoglobin* 2014;38:211-2.
 167. Giardine BM, Joly P, Pissard S, et al. Clinically relevant updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D1192-6.
 168. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory quality assurance committee. standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.

Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-epoxide measurement with the reference LC-MS/MS method and a routine immunoassay

Daide Negrini, Walter Magon, Denise Peserico, Giuseppe Lippi, Elisa Danese

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

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, sotto forma di Poster, ricevendo il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Introduction: Carbamazepine is a common antiepileptic drug used for treatment of epilepsy and other neurologic conditions. Carbamazepine-10,11-epoxide, one of its metabolites, is pharmacologically active and its values increase with concomitant use of other anticonvulsants. This study is aimed to compare the method used in our routine laboratory with a reference LC-MS/MS method for monitoring Carbamazepine, and to compare the concentrations of the drug to one of its metabolites.

Methods: plasma samples were collected from patients for whom Carbamazepine measurement had been requested. For each plasma sample, Carbamazepine was assayed on Roche Cobas with Cobas CARB4 kit (immunoassay). Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-epoxide determination were then performed with a validated and verified LC-MS/MS technique.

Results: the study population consisted of 30 subjects. No significant differences were found between the routine immunoassay and the LC-MS/MS technique using Passing-Bablok regression and Bland-Altman graph, whilst the concentrations of plasma Carbamazepine and its epoxide measured with LC-MS/MS displayed a very modest correlation ($r=0.639$). The ratio calculated between Carbamazepine and its epoxide displayed a broad range of values (3.37-12.55).

Discussion: considering the clinical significance of Carbamazepine measurement as part of TDM, we confirmed the validity of our routinely used immunoassay as easier and faster alternative to the reference method for routine quantification of plasma Carbamazepine concentration. Considering that levels of the epoxide are unpredictable and independent from the parent drug concentrations, a more comprehensive assessment of Carbamazepine metabolites should be considered, especially when patients have uncontrolled symptoms or display challenging dose adjustment.

Keywords: LC-MS/MS, Carbamazepine, TDM

INTRODUCTION

Carbamazepine has been originally discovered in 1953 and was first marketed in the UK in 1962 for the treatment of trigeminal neuralgia. This drug is now considered one of the oldest and most common anticonvulsant and mood-stabilizing agent, approved for a wide range of diseases such as epilepsy, bipolar disorder, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), schizophrenia, phantom-limb syndrome, complex regional pain syndrome and others. It is particularly effective in treatment of partial and generalized tonic-clonic seizures, whilst it has lower efficacy

in patients with absence or myoclonic seizures (1).

Carbamazepine acts by blocking fast voltage-dependent sodium channels, binding to inactivated channels and slowing down renewal activation (1). Although many newly released drugs with the same targets have been approved over time, the well-established efficacy and safety profile lead physicians to continue prescribing Carbamazepine alongside other first-generation antiepileptic drugs (2).

Its biotransformation is catalysed by cytochrome P450 (CYP) enzymes, with the predominant isoforms being CYP3A4 and CYP3A5 (3). The main metabolite is

Corresponding Author: Davide Negrini, Section of Clinical Biochemistry, University of Verona p.le L.A. Scuro, 10 - 37134 Verona (VR), Tel +39 045/8124646, E-mail davide.negrini@aovr.veneto.it

Ricevuto: 22.11.2021

Revisionato: 14.12.2021

Accettato: 18.01.2022

Publicato on-line: 27.01.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.004

Carbamazepine-10,11-epoxide which is pharmacologically active and potentially toxic. Its plasma concentrations increase with concurrent use of other anticonvulsants (4). More specifically, a number of studies showed an increase in Carbamazepine-10,11-epoxide to Carbamazepine ratio when Carbamazepine is combined with phenytoin, phenobarbital, primidone and valproic acid. Increase in this ratio was also observed in patients with moderate to severe renal disease as well as in young children mainly due to higher rates of metabolism. Since great interindividual variations were found in the serum concentration of both parent drug and its metabolite after a given dose and the pharmacodynamics of Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-epoxide are different (5), some authors have suggested that routine monitoring of both serum concentrations is necessary for the assessment of a safe and effective therapeutic regimen for epileptic patients, especially for those on polytherapy.

The determination of the epoxide metabolite of Carbamazepine using chromatography is an old strategy, with published notes and articles since 1978 (6-8), investigating drug kinetics and relative concentrations.

The aim of this study is twofold: a comparison between levels of Carbamazepine in plasma samples with the routine assay used in our laboratory (immunoassay on an automated clinical chemistry platform) and a reference technique (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; LC-MS/MS), and a comparison between Carbamazepine and its main metabolite concentrations in routine clinical samples.

METHODS

Plasma (Li-heparin) samples were collected from patients for whom Carbamazepine therapeutic monitoring was clinically requested in the local laboratory from May 31st to July 16th, 2021. In each plasma sample, Carbamazepine was assayed with a Roche Cobas c702 module (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Switzerland), using Cobas Online TDM Carbamazepine Gen.4 ("CARB4") kit (homogeneous microparticle agglutination immunoassay using sheep monoclonal anti-Carbamazepine antibodies) on the same day of collection, whilst residual sample volumes were anonymized, aliquoted and kept at -20 °C until liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

LC-MS/MS analysis was performed with a Shimadzu Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)

chromatographic system coupled with an AB Sciex 4500 MD triple quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany). ClinMass Antiepileptic Drugs kit (Recipe Chemicals Instruments GmbH, Munchen, Germany) was used for determining in Electrospray Ionization (ESI) positive Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-epoxide, using MRM transitions as specified in Table 1 and using d10-Carbamazepine as internal standard. In agreement with local certification procedures, considering that this the used LC-MS/MS method is CE/IVD-marked, the verification consisted in evaluation of evaluating:

- imprecision, carried out using a 3x5 scheme for two control levels (level 1: Carbamazepine 18.6 µmol/L, Carbamazepine-10,11-epoxide 7.26 µmol/L; level 2: Carbamazepine 42.0 µmol/L, Carbamazepine-10,11-epoxide 16.6 µmol/L; the concentrations were declared by manufacturer) and MetComp 1.0 software according to the paper issued by the SIBioC study group "Statistica per il Laboratorio" (9) considering CV% lower than 10% as our analytical goal;
- Lower Limit Of Quantification (LLOQ), evaluated by 20 replicates (instead of 40, to reduce the number of tests needed for the verification procedure and contain costs) of a dilution of the lowest calibrator with a plasma pool free from antiepileptic drugs (patients not in therapeutic regimen) to obtain a final concentration declared by the manufacturer looking for a CV% lower than 20% and a bias lower than 15% (10);
- linearity, evaluated diluting at 5 levels the highest calibrator (Carbamazepine 90.2 µmol/L, Carbamazepine-10,11-epoxide 28.8 µmol/L; concentrations declared by manufacturer) with a plasma pool free from antiepileptic drugs (patients not in therapeutic regimen).

Final concentrations were expressed in µmol/L. Data were collected and graphically explored using Google Sheets (version 2021-June) (Google LLC, Mountain View, CA, USA) and then were analysed using MetComp 1.0 software (9) and Stata MP 14.1 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) with "CI2" module (11).

Comparison between Carbamazepine immunoassay and Carbamazepine LC-MS/MS was accomplished by using Passing-Bablok regression and Bland-Altman graph.

Associations between Carbamazepine and its epoxide were evaluated using Pearson's correlation (Stata functions "pccorr" and "ci2").

Table 1

Mass transitions and retention times of the analytes and the isotope-labelled substances in the internal standard measured with Electrospray Ionization (ESI) positive mode

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Retention time (minutes)
Carbamazepine	237.1	165.1	3.35
Carbamazepine-Epoxide	253.1	180.1	2.61
d10-Carbamazepine	247.1	175.1	3.34

RESULTS

The final study population consisted of 30 subjects (12 females and 18 males; median age 45 years, range 0-80).

Method verification confirmed imprecision for both Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-epoxide below 10% at both control levels (MetComp 1.0 software reported CV%; level 1: Carbamazepine 4.033%, Carbamazepine-10,11-epoxide 6.502%; level 2: Carbamazepine 2.223%, Carbamazepine-10,11-epoxide 7.689%). Manufacturer's data of LLOQ (0.1 $\mu\text{mol/L}$ for Carbamazepine and 0.3 $\mu\text{mol/L}$ for Carbamazepine-10,11-epoxide) was also verified both for imprecision below 20% CV (Carbamazepine 6.4%, Carbamazepine-10,11-epoxide 18.2%) and for bias below 15% (Carbamazepine 3.8%, Carbamazepine-10,11-epoxide 7.0%). The linearity studies revealed a correlation of $r > 0.97$ for both analytes, and each point had a difference between calculated and determined lower than our analytical goal (10%).

The comparison using MetComp 1.0 software reported for the Passing-Bablok regression a non-significant deviation from linearity [$p > 0.05$; slope: 0.8439 (95% Confidence Interval (CI) 0.7629 to 0.9347); intercept: 5.1160 (95% CI 1.9075 to 8.2081)] between immunoassay (Roche Cobas) and LC-MS/MS (Figure 1, panel a), and a non-significant bias of 0.161% (95% CI -2.450% to 2.773%) (absolute bias 0.400 $\mu\text{mol/L}$) was observed in the Bland-Altman graph (Figure 1, panel b). Patients' samples had concentrations (looking at LC-MS/MS method results) between 11.9 and 49.5 $\mu\text{mol/L}$ for Carbamazepine (mean 34.7, SD 9.0) and between 2.1 and 11.9 $\mu\text{mol/L}$ for Carbamazepine-10,11-epoxide (mean 6.0, SD 2.7).

LC-MS/MS concentrations of Carbamazepine and its epoxide metabolite were not highly correlated ($r=0.639$; 95% CI: 0.362 to 0.812) and graphically dispersed (Figure 2).

The ratio calculated between Carbamazepine and its epoxide displayed a broad range of values, between 3.37 and 12.55 (mean 6.52, SD 2.20). Considering the metabolite-to-parent ratio (5), values ranged between 0.0797 and 0.2967.

DISCUSSION

Therapeutic drug monitoring (TDM) represents an essential tool for optimizing treatments by individualizing dosage regimens based on blood drug concentration measurement. The lack of clinical response or a clear physiological marker represent the main drawbacks for implementation of TDM of anticonvulsants in clinical practice. Moreover, non-response at therapeutic doses, uncertain drug adherence, suboptimal tolerability as well as pharmacokinetic drug-drug interactions are other important indications for TDM of antiepileptic drugs. In particular, TDM of Carbamazepine is strongly recommended by current guideline because:

- reported therapeutic reference ranges are established;
- controlled clinical trials have shown beneficial effects of TDM;
- reports on decreased tolerability or intoxications are available (12).

Toxic effects of Carbamazepine include incoordination, blurred vision, diplopia, drowsiness, nystagmus, ataxia, headache, arrhythmias, nausea and vomiting, hyponatraemia, aplastic anaemia and agranulocytosis.

Biotransformation of Carbamazepine by phase 1 hepatic enzymes leads to a major metabolite named Carbamazepine-10,11-epoxide, which is equipotent to Carbamazepine and contributes to clinical effects, especially to adverse events (13,14). Since Carbamazepine-10,11-epoxide displays different pharmacokinetics and pharmacodynamics properties as its respective parent compound, the concomitant determination of both the parent drug and its metabolite is advisable in patients taking Carbamazepine (5,12), so that the efficacy of treatment can be improved, but also for assessing compliance and drug-drug interactions (5,15-17) and to reduce risk in overdose with possible poisoning and mortality (18).

Therapeutic and toxic levels of Carbamazepine are listed between 17 and 51 $\mu\text{mol/L}$ and 84.6 $\mu\text{mol/L}$,

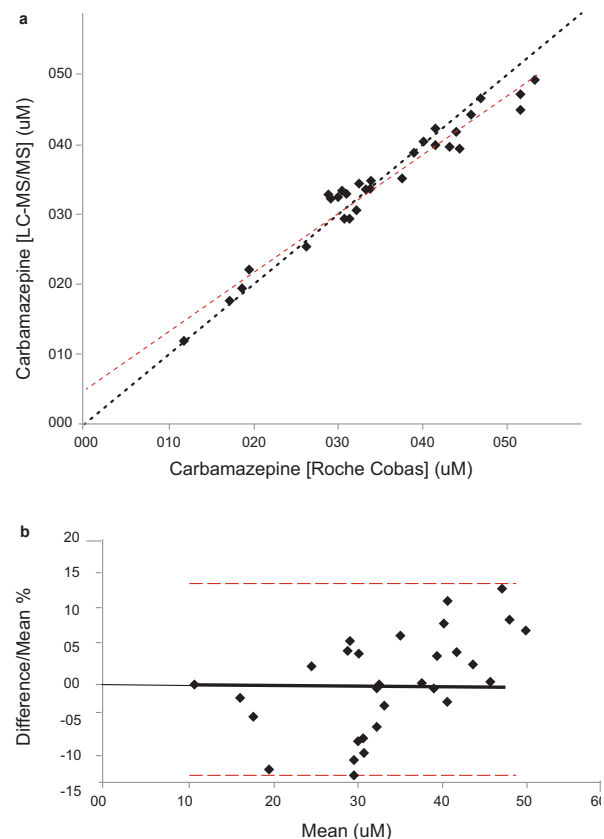


Figure 1
Comparison between immuno-assay and LC-MS/MS assay using a: Passing-Bablok regression and b: Bland-Altman graph. Panel a: red dashed line, regression line; black line, identity line. Panel b: black bold line, bias; red dashed lines, 95% confidence Interval of differences.

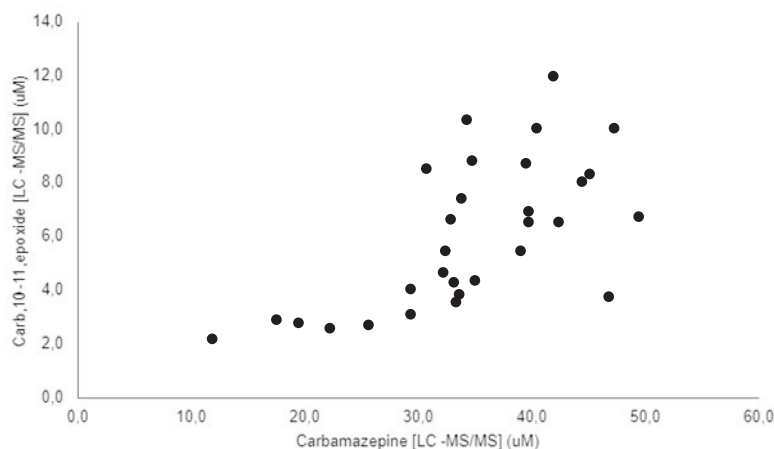


Figure 2

Comparison between Carbamazepine and its epoxide metabolite.

respectively (5,19). The therapeutic range for Carbamazepine-10,11-epoxide is not yet established, but is considered to be 1.6-16.0 µmol/L. According to some authors, the concentration of the epoxide should not exceed 35.6 µmol/L in order to prevent toxic effects (20).

Considering the clinical significance of Carbamazepine assessment as part of TDM, we confirm the reliability of the immunoassay used in our laboratory as easier and faster alternative to the reference technique for routine quantification of Carbamazepine concentration in patient plasma samples. Nonetheless, considering that the epoxide metabolite is equipotent to Carbamazepine and contribute to clinical effects (especially to adverse reactions) (5), when patients have uncontrolled symptoms or are challenged by dose adjustment, a more comprehensive assessment of Carbamazepine metabolites should be considered. Moreover, by analysing the ratio between the drug and its metabolite we found a high range of values, which could be explained by the different inter-individual metabolism and/or response to the drug, which is probably influenced by multiple factors like age, sex and polypharmacotherapy interactions, ultimately underpinning the importance of simultaneous assessment of both Carbamazepine and its active metabolite to obtain better monitoring of Carbamazepine treatment.

In particular, it has been demonstrated that the concomitant use of other anticonvulsants including phenytoin, phenobarbital and primidone which are well known cytochrome P450 inducers or valproic acid which inhibits CYP isoforms and the epoxide hydrolase (the enzyme responsible for conversion of Carbamazepine-10,11-epoxide to an inactive form) (4,21), could increase the ratio.

The Passing-Bablok regression and Bland-Altman graph indicated a good agreement between the Carbamazepine concentration measured with LC-MS/MS method and immunoassay, although a mean increase of 0.4 µmol/L was observed with the latter. Similar and even greater bias have been observed by other authors which

imputed the difference to the cross-reactivity and matrix effect intrinsically characteristic of immunoassays and which had, however, no clinical relevance (22).

As highlighted by our data, the metabolite-to-parent compound ratio observed in the study, appears slightly higher than the one proposed by the current guidelines (5); however it overlaps the ratio reported earlier by Ji et al. (0.08-0.30 versus 0.07-0.25) (23).

Given the small sample size and the lack of clinical and pharmacological information from our population, further studies are needed to establish the relation between Carbamazepine and its epoxide metabolite concentrations, and to accurately define the reference range of the metabolite.

REFERENCES

1. Tolou-Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, et al. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *J Res Med Sci* 2013;18:S81-5.
2. Beydoun A, DuPont S, Zhou D, et al. Current role of carbamazepine and oxcarbazepine in the management of epilepsy. *Seizure* 2020;83:251-63.
3. Miyata-Nozaka Y, Mohd Zain S, Taguchi M, et al. Carbamazepine 10,11-epoxidation in human liver microsomes: influence of the CYP3A5*3 polymorphism. *Pharmazie* 2017;72:747-50.
4. Potter JM, Donnelly A. Carbamazepine-10,11-Epoxide in Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit* 1998;20:652-7.
5. Hiemke C, Bergemann N, Clement H, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry* 2018;51:9-62.
6. Wad N, Rosenmund H. Rapid quantitative method for the simultaneous determination of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, diphenylhydantoin, mephenytoin, phenobarbital and primidone in serum by thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 1978;146:167-8.
7. McKauge L, Tyrer JH, Eadie MJ. Factors influencing simultaneous concentrations of carbamazepine and its epoxide in plasma. *Ther Drug Monit* 1981;3:63-70.

8. Westenberg HGM, van der Kleijn E, Oei TT, et al. Kinetics of carbamazepine and carbamazepine-epoxide, determined by use of plasma and saliva. *Clin Pharmacol Ther* 1978;23:320-8.
9. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2015;40:129-42.
10. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; approved guideline, 1st ed.* CLSI document C62-A. CLSI Wayne, PA, 2014.
11. Seed P. CI2: Stata module to compute confidence intervals for correlations, <https://econpapers.repec.org/software/bocbocode/s423603.html> (accessed: November 2021).
12. Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, et al. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1228-55.
13. Marcus SC, Olfson M, Pincus HA, et al. Therapeutic drug monitoring of mood stabilizers in Medicaid patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 1999;156:1014-8.
14. Petit P, Lonjon R, Cociglio M, et al. Carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in acute mania: clinical and pharmacokinetic correlates. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;41:541-6.
15. Touw DJ, Neef C, Thomson AH, et al. Cost-Effectiveness of Therapeutic Drug Monitoring: A Systematic Review. *Ther Drug Monit* 2005;27:10-7.
16. Bates DW, Soldin SJ, Rainey PM, et al. Strategies for physician education in therapeutic drug monitoring. *Clin Chem* 1998;44:401-7.
17. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, et al. Antiepileptic drugs best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2008;49:1239-76.
18. Brahmi N, Kouraichi N, Abderrazek H, et al. Clinical Experience with carbamazepine overdose: relationship between serum concentration and neurological severity. *J Clin Psychopharmacol* 2008;28:241-3.
19. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, et al. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care* 2012;16:R136.
20. Burianová I, Bořecká K. Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary? *Clin Biochem* 2015;48:866-9.
21. Brodie MJ, Forrest G, Rapeport WG. Carbamazepine 10, 11 epoxide concentrations in epileptics on carbamazepine alone and in combination with other anticonvulsants. *Br J Clin Pharmacol* 1983;16:747-9.
22. Krasniqi S, Zeitlinger M, Bauer S. Comparison between the immunoassay and high performance liquid chromatography for therapeutic monitoring of carbamazepine and phenytoine. *Biochem Med* 2010;20:341-9.
23. Ji P, Damle B, Xie J, et al. Pharmacokinetic Interaction Between Efavirenz and Carbamazepine After Multiple-Dose Administration in Healthy Subjects. *J Clin Pharmacol* 2008;48:948-56.

Evaluation of a panel of polymorphisms in vitamin D-related genes, vitamin D status and Multiple Sclerosis

Luisa Agnello¹, Concetta Scazzone¹, Bruna Lo Sasso¹, Rosaria Vincenza Giglio¹, Caterina Maria Gambino¹, Matteo Vidali², Marcello Ciaccio^{1,3}

¹Institute of Clinical Biochemistry, Clinical Molecular Medicine and Clinical Laboratory Medicine, Department of Biomedicine, Neurosciences and Advanced Diagnostics, University of Palermo, Palermo, Italy

²Foundation IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

³Department of Laboratory Medicine, University Hospital "P. Giaccone", Palermo, Italy

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC - 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, sotto forma di Poster, ricevendo il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati

ABSTRACT

Introduction: the role of hypovitaminosis D as risk factor for Multiple Sclerosis (MS) is well known. Vitamin D status is the result of the interaction between environmental and genetic factors. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes codifying for molecules involved in vitamin D pathway have been associated with an increased risk of MS. However, few studies evaluated the association of these SNPs with MS severity. The aim of this study was to investigate the association among a panel of vitamin D-related SNPs, vitamin D *status*, and MS severity.

Methods: one hundred MS patients were enrolled in the study. Serum 25(OH)D₃ levels and genotyping of SNPs in vitamin D-related genes were evaluated in all patients by high-performance liquid chromatography or real-time polymerase chain reaction. MS severity was assessed by Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS).

Results: three SNPs of the *NADSYN1* gene, namely rs3829251, rs7944926 and rs12785878, and the rs2248137 SNP of the *CYP24A1* gene were significantly associated with 25(OH)D₃ levels. However, neither serum 25(OH)D₃ levels nor the SNPs of the *NADSYN1* or of the *CYP24A1* genes were associated with disease severity.

Discussion: in this study, we assessed the hypothesis that the presence of SNPs in vitamin D-related genes could influence MS severity. However, the statistical analysis indicates that there is no correlation between the severity of the disease and the polymorphisms considered.

Keywords: *gene, multiple sclerosis, vitamin D*

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS), characterised by demyelination and axonal degeneration, which lead to progressive irreversible disability (1). It is a multifactorial disease resulting, from the interaction among environmental, genetic, and epigenetic factors. The role of hypovitaminosis D as risk factor for MS is well known and supported by several literature evidence (2-5).

Noteworthy, vitamin D status is influenced by both environment, such as sun exposure, and genetic. Genome-wide association studies and case control studies found several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in vitamin D-related genes associated with an increased risk of MS (3,6). However, only a few studies investigated the potential role of such SNPs on the MS severity.

The aim of this study was to assess the association among SNPs in vitamin D-related genes, vitamin D *status* and MS severity.

Corresponding Author: Luisa Agnello, Institute of Clinical Biochemistry, Clinical Molecular Medicine and Clinical Laboratory Medicine, Department of Biomedicine, Neurosciences and Advanced Diagnostics, University of Palermo, Palermo, Italy, E-mail luisa.agnello@gmail.com

Received: 11.01.2022

Revised: 26.01.22

Accepted: 11.02.22

Published on-line: 09.03.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.010

METHODS

This observational study was performed at the University Hospital of Palermo, Italy. We enrolled one hundred patients with MS from Neurology Unit the Unit of Neurology. The MS diagnosis was made by an experienced neurologist based on a previous the history of the disease, physical examination, cerebrospinal fluid analysis, and magnetic resonance imaging findings, according to the revised McDonald criteria (7). The neurological status of patients was assessed using Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS). The progression of disability was assessed using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (8). The annualized relapse rate (ARR) was calculated in the year prior to the genotyping.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Palermo (nr 07/2016) and was performed in accordance with the current revision of the Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from all patients included in the study.

All laboratory analyses were performed at the Institute of Clinical Biochemistry, Clinical Molecular Medicine and Clinical Laboratory Medicine, Department of Biomedicine, Neurosciences, and Advanced Diagnostics.

25-hydroxy-vitamin D₃ [25(OH)D₃] levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the Chromosystem reagent kit

(Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH; Grafelfing, Munich, Germany) and a chromatographic system equipped with a Waters 1525 Binary HPLC pump connected to a photodiode array detector; detection was carried out at 265 nm. Chromatographic separation was performed as follows: C18 analytical column, column temperature 25 °C, flow rate 0.7 mL min⁻¹, wavelength 265 nm and sample injection volume 50 µL. Chromatographic separation was performed with isocratic elution with a retention time of 4.2 min. In accordance with the manufacturer's instruction, a serum 25(OH)D₃ concentration of 30 µg/L was considered the threshold value for identifying low levels of vitamin D.

Genomic DNA was extracted from 200 µL of whole peripheral blood using a commercial kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer. The DNA quality was evaluated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, quantified by using absorbance spectrophotometric analysis and stored at -20 °C for subsequent analysis. We selected the following 18 SNPs in genes codifying molecules involved in the vitamin D pathway: *NADSYN1* (rs3829251, rs7944926, and rs12785878), *CYP2R1* (rs10766197 and rs10741657), *VDBP* (rs7041 and rs4588), *VDR* (rs1544410, rs7975232, rs731236, rs2228570), *RXR-α* (rs9409929 and rs12004589), *KLOTHO* (rs9536314 and rs1207568), *CYP24A1* (rs2762939 and rs2248137), and *CYP27A1* (rs17470271) (Table 1).

Table 1
Characteristics of vitamin D-related Single Nucleotide Polymorphisms

Gene	Chromosome	SNP	Ancestral allele	Substitution allele
<i>NADSYN1</i>	11	rs3829251	G	A
		rs7944926	G	A
		rs12785878	G	T
<i>CYP2R1</i>	11	rs10766197	G	A
		rs10741657	G	A
<i>VDBP</i>	4	rs7041	G	T
		rs4588	C	A
<i>VDR</i>	12	rs1544410 (Bms-I)	B	b
		rs7975232 (Apa-I)	A	a
		rs731236 (Taq-I)	T	t
		rs2228570 (Fok-I)	F	f
<i>RXR-α</i>	9	rs9409929	G	A
		rs12004589	G	A
<i>KLOTHO</i>	13	rs9536314	T	G
		rs1207568	G	A
<i>CYP24A1</i>	20	rs2762939	G	C
		rs2248137	G	C
<i>CYP27A1</i>	2	rs17470271	T	A

NADSYN1, NAD Synthetase 1; *CYP*, cytochrome P450; *VDBP*, Vitamin D Binding Protein; *VDR*, Vitamin D Receptor; *RXR-α*, Retinoid X Receptor-α; *SNP*, single nucleotide polymorphisms.

SNPs in *NADSYN1*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27A1*, *RXR- α* , and *KLOTHO* genes were analysed by real-time allelic discrimination TaqMan assay on a 7500 real-time polymerase chain reaction (PCR) system (Applied Biosystems), as previously described (9-12). SNPs in *VDR* and *VDBP* genes were assessed by PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, as previously described (13-14).

Statistical analysis was performed by SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R Language v.3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Quantitative variables were expressed by the median, interquartile range (IQR) and min-max range, while categorical variables by relative frequencies. Differences between groups were evaluated by nonparametric Kruskal-Wallis or Mann-Whitney test, with Bonferroni's correction when needed. Association was evaluated by nonparametric Spearman's rank correlation coefficient and the Fisher's exact test.

RESULTS

One hundred MS patients (F:M 75:25%), with a median (IQR) age of 39 (32-47) years, were investigated. 82% and 14% displayed, respectively, a Relapsing-Remitting (RRMS) or a Secondary Progressive Multiple Sclerosis (SPMS) form of the disease. EDSS ranged between 0 and 7.5 with median (IQR) of 2.25 (1.4-5.0). Median (IQR) MSSS and median (IQR) ARR were, respectively, 3.34 (1.45-5.48) and 1 (1-2). Median (IQR, min-max) levels of vitamin D were 20 (16-25, 13-44) $\mu\text{g/L}$, with up to 87% of the subjects investigated displaying a vitamin D concentration $<30 \mu\text{g/L}$.

The association between vitamin D levels and polymorphisms was evaluated. Heterozygous carriers (n=25) of the substitution A allele for the rs3829251 SNPs of the *NADSYN1* gene displayed significantly lower vitamin D levels than homozygous carriers (n=75) of the ancestral G allele (19 versus 22 $\mu\text{g/L}$, p=0.024). Homozygous A carriers were not present in the population investigated. Similarly, heterozygous carriers (n=52) of the substitution A alleles for the rs7944926 SNPs of the *NADSYN1* gene displayed significantly lower vitamin D levels than homozygous carriers (n=43) of the ancestral G allele (19 versus 24 $\mu\text{g/L}$, Bonferroni's correction p=0.024). No significant difference was instead evident between A homozygous (n=5) and G homozygous (n=43) (24 versus 24 $\mu\text{g/L}$, p=1.000) or between A homozygous and heterozygous (24 versus 19 $\mu\text{g/L}$, p=0.822). An association was also found between the rs12785878 SNP of the *NADSYN1* gene and vitamin D levels (KW test, p=0.047): T homozygous (n=44) displayed marginally significant higher vitamin D levels than heterozygous (n=51) (23 versus 19 $\mu\text{g/L}$, Bonferroni's correction p=0.051), whereas no other significant *post-hoc* comparison was found. Moreover, G homozygous (n=5) displayed similar vitamin D levels than T homozygous (24 versus 23 $\mu\text{g/L}$). Among the other SNPs, the substitution allele C of the rs2248137 SNP of the *CYP24A1* gene was found to be associated with vitamin D levels (KW, p=0.026).

In particular, C homozygous (n=38) displayed significant lower vitamin D levels than heterozygous (n=45) (19 versus 24 $\mu\text{g/L}$, Bonferroni's correction p=0.036). No other difference resulted to be statistically significant, with C homozygous showing similar vitamin D levels than G homozygous (n=17) (19 versus 20 $\mu\text{g/L}$). No other SNPs were found significantly associated to vitamin D. The rs3829251, rs7944926 and rs12785878 SNPs of the *NADSYN1* gene were significantly associated (p<0.001), while no SNP of the *NADSYN1* gene was associated to the rs2248137 SNP of the *CYP24A1* gene. Interestingly, no significant correlation was found between vitamin D and EDSS (rho=-0.091; p=0.403), MSSS (rho=-0.159; p=0.146) or ARR (rho=-0.097; p=0.373). Accordingly, no association was found between the rs3829251, the rs7944926, the rs12785878 SNPs of the *NADSYN1* gene or the rs2248137 SNP of the *CYP24A1* gene and EDSS, MSSS or ARR.

DISCUSSION

Multiple sclerosis is a complex disease and genetic greatly contributes to its pathogenesis. It is well known that MS is not a monogenic disorder, but several SNPs contribute to the risk of developing it. Noteworthy, each individual SNP contributes little to the MS risk but their combination significantly influences it. Among all investigated SNPs, some Authors found a role for genetic variants related to vitamin D metabolism. The latter is characterised by several steps and, consequently, several enzymes and proteins are involved (15-17). Briefly, vitamin D₃ is mainly synthesised in the skin from 7-dehydrocholesterol (7-DHC), which represents a common substrate between cholesterol and vitamin D. The enzyme *NADSYN1* is involved in the regulation of the availability of 7-DHC for vitamin D₃ synthesis. The activation of Vitamin D₃ depends on two hydroxylation reactions. The first occurs in the liver and lead to the conversion of vitamin D₃ in 25(OH)D₃, which represents the main circulating form of vitamin D₃. It is biologically inactive and it has a long half-life. The second hydroxylation catalyses the conversion of 25(OH)D₃ into 1,25(OH)₂D₃, which represents the active form of vitamin D₃. This hydroxylation takes place in different tissues, organs, and cells, including kidneys, CNS, and immune cells. *CYP2R1* has a key role in the first step of hydroxylation. Also, *CYP27A1* contributes to the hydroxylation of vitamin D₃ but to a lesser extends than *CYP2R1*. 1,25(OH)₂D₃ exerts its biological function through the interaction with a cytoplasmic complex, consisting of *VDR* and *RXR- α* . Such trimeric complex migrates to the nucleus and regulates positively or negatively the expression of genes harbouring vitamin D responsive element (VDRE) in their promoter region. Finally, *Klotho* is an important regulator of vitamin D homeostasis. The inactivation of 1,25(OH)₂D₃ is catalysed by *CYP24A1*, which converts it into 24-hydroxylated products, inactive metabolites.

SNPs in vitamin D-related genes were previously

associated with MS susceptibility. In this study, we investigated the potential relationship among vitamin D status, vitamin D-related SNPs and MS severity. We did not find an association between vitamin D levels, NADSYN1 or CYP24A1, and MS severity.

Our findings are in accordance with other Authors that also failed to find an association between polymorphisms in several genes, including vitamin D-related ones, and MS severity (18-20). Moreover, despite our data have shown significant association between some SNPs and vitamin D, the finding of similar vitamin D levels displayed by homozygotes for the ancestral allele and homozygotes for the substitution allele, seems to suggest the presence of spurious associations. To date, the contribution of genetic to MS disability progression is far to be clarified. It can be hypothesised that different factors can guide the susceptibility and severity of the disease.

This study has some limitations, including the small sample size and the study design. Indeed, we used a candidate gene approach and chose previously-identified common genetic variants. The strength is that we evaluated several vitamin D-related SNPs for each patient.

CONCLUSION

In this study, we first evaluate the possible influence of several SNPs in vitamin D-related genes on MS severity. Although we did not find any association between vitamin D levels, SNPs and MS progression, further studies are required to confirm such findings.

REFERENCES

1. Van Schependom J, Guldolf K, D'hooghe MB, et al. Detecting neurodegenerative pathology in multiple sclerosis before irreversible brain tissue loss sets in. *Transl Neurodegener* 2019;8:37.
2. Ao T, Kikuta J, Ishii M. The Effects of Vitamin D on immune system and inflammatory diseases. *Biomolecules* 2021;11:1624.
3. Scazzone C, Agnello L, Bivona G, et al. Vitamin D and genetic susceptibility to Multiple Sclerosis. *Biochem Genet* 2021;59:1-30.
4. Bivona G, Agnello L, Bellia C, et al. Non-skeletal activities of Vitamin D: from physiology to brain pathology. *Medicina (Kaunas)* 2019;55:341.
5. Bivona G, Agnello L, Ciaccio M. Vitamin D and immunomodulation: is it time to change the reference values? *Ann Clin Lab Sci* 2017;47:508-10.
6. Niino M, Miyazaki Y. Genetic polymorphisms related to vitamin D and the therapeutic potential of vitamin D in multiple sclerosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2015;93:319-25.
7. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
8. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64:1144-51.
9. Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B, et al. CYP27A1, CYP24A1, and RXR- α Polymorphisms, Vitamin D, and Multiple Sclerosis: a pilot study. *J Mol Neurosci* 2018;66:77-84.
10. Scazzone C, Agnello L, Ragonese P, et al. Association of CYP2R1 rs10766197 with MS risk and disease progression. *J Neurosci Res* 2018;96:297-304.
11. Scazzone C, Agnello L, Sasso BL, et al. Klotho and vitamin D in multiple sclerosis: an Italian study. *Arch Med Sci* 2019;16:842-7.
12. Scazzone C, Agnello L, Bivona G, et al. Vitamin D and genetic susceptibility to Multiple Sclerosis. *Biochem Genet* 2021;59:1-30.
13. Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 2016;37:261-7.
14. Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B, et al. VDBP, CYP27B1, and 25-Hydroxyvitamin D Gene Polymorphism Analyses in a Group of Sicilian Multiple Sclerosis Patients. *Biochem Genet* 2017;55:183-92.
15. Ellison DL, Moran HR. Vitamin D: Vitamin or Hormone? *Nurs Clin North Am* 2021;56:47-57.
16. Ramasamy I. Vitamin D metabolism and guidelines for vitamin d supplementation. *Clin Biochem Rev* 2020;41:103-26.
17. Bouillon R, Bikle D. Vitamin D metabolism revised: fall of dogmas. *J Bone Miner Res* 2019;34:1985-92.
18. Kalincik T, Guttman CR, Krasensky J, et al. Multiple sclerosis susceptibility loci do not alter clinical and MRI outcomes in clinically isolated syndrome. *Genes Immun* 2013;14:244-8.
19. George MF, Briggs FB, Shao X, et al. (2016) Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurol Genet* 2016;2:e87.
20. Čierny D, Michalik J, Kurča E, et al. FokI vitamin D receptor gene polymorphism in association with multiple sclerosis risk and disability progression in Slovaks. *Neurol Res* 2015;37:301-8.

Diagnostica molecolare per il SARS-CoV-2: un programma sperimentale per la Valutazione Esterna di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio

Luisa Galla¹, Laura Sciacovelli^{1,2}, Andrea Padoan^{1,3}, Mario Plebani^{2,3}

¹UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova

²Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, Centro Specializzato della Regione Veneto, Padova

³Dipartimento di Medicina-DIMED, Università di Padova, Padova

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, sotto forma di Poster, ricevendo il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Molecular diagnostic for SARS-CoV-2: an experimental External Quality Assessment Scheme.

Introduction: external Quality Assessment (EQA) is a valuable tool to monitor and improve the analytical performances of clinical laboratories. To guarantee suitable results also during the COVID-19 pandemic, EQA scheme providers have implemented specific schemes assessing different SARS-CoV-2 diagnostic systems. This study aims to describe the results collected in an experimental EQA scheme for molecular diagnostic of SARS-CoV-2 managed by INSTAND eV with the collaboration of the Centre of Biomedical Research for Quality in Laboratory Medicine for Veneto Region Laboratories.

Methods: the qualitative EQA results collected in three surveys (two in 2020 and one in 2021) for 18 samples total, have been summarized to identify the percentage of laboratory results per sample. Control samples were provided by Nationales Konsiliarlaboratorium für Coronaviren of Berlin.

Results: even though the average of the participating laboratories strongly decreased between surveys, a good agreement was found among results (95% to 99.8%). A totally of 0.2% - 4% of incorrect results and 0% - 1.1% of indeterminate results were reported. In addition, the sequencing analysis and the point mutations analysis, included in the last analyzed survey, revealed a good agreement between participating laboratories with an overall score from 74.8% to 89.6% for the sequencing and from 90.65% to 95.33% for the point mutations, respectively.

Conclusions: the EQA programs are a fundamental quality assurance tool to evaluate the laboratory performance and to appreciate the State-of-the-Art of the different diagnostic systems used by participating laboratories. The need for an EQA scheme for every test performed in the laboratory is mandatory to guarantee patient safety.

Parole chiave: diagnostica molecolare, SARS-CoV-2, valutazione esterna di qualità (VEQ)

INTRODUZIONE

L'epidemia causata dal coronavirus SARS-CoV-2 denominata COVID-19, dal primo caso confermato a Wuhan (Cina) nel Dicembre del 2019, ha avuto un forte impatto sia a livello di salute pubblica che a livello economico in tutto il mondo.

Per controllare la rapida trasmissione del virus risulta necessaria una pronta e accurata identificazione di tutti gli individui infetti indipendentemente dalla presenza di sintomi (ad esempio tosse, dispnea, febbre, anosmia) (1). Infatti, sebbene la fonte più comune di trasmissione del virus sia rappresentata da individui sintomatici, anche i soggetti asintomatici possono diffondere il virus e la mancata diagnosi può portare ad un aumento del

rischio generale di trasmissione e di conseguenza all'incremento di infezioni da SARS-CoV-2. La diagnosi accurata e precoce di infezione da SARS-CoV-2 risulta quindi fondamentale per ridurre il rischio di trasmissione e per consentire un isolamento rapido e la tracciabilità dei contatti (2,3).

La diagnosi clinica di COVID-19 può essere effettuata sulla base dei sintomi sistemici, delle indagini radiologiche (tomografia toracica) e di quelle epidemiologiche, ma le analisi di laboratorio risultano essere fondamentali per la diagnosi eziologica. Esse prevedono sia esami per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2, quali i test molecolari (rilevazione degli acidi nucleici virali) e i test antigenici (3,5), sia gli esami per l'identificazione della risposta immunitaria contro l'infezione già risolta

Corrispondenza a: Luisa Galla, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova, E-mail luisa.galla@studenti.unipd.it

Ricevuto: 05.01.2022

Revisionato: 26.01.2022

Accettato: 18.02.2022

Publicato on-line: 09.03.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.011

o in corso da SARS-CoV-2 (6,7), quali i test sierologici. Inoltre, anche altre analisi di laboratorio, quali il conteggio differenziale dei leucociti, la proteina C-reattiva, la procalcitonina, il D-dimero e le citochine infiammatorie risultano importanti, sia per la gestione dei pazienti affetti da COVID-19, sia per la valutazione della gravità della malattia (8). L'approccio diagnostico migliore per la rilevazione del virus e per la identificazione di fasi specifiche della malattia deve tener conto del tipo di campione utilizzato (tamponi nasofaringei, tamponi orofaringei, espettorato, altre secrezioni delle vie respiratorie inferiori, sangue, feci e saliva) e le quantità di campione ottenuto (2), ma anche i cambiamenti dinamici della carica virale e dei marcatori sierologici durante lo sviluppo della malattia (8).

Da quando la sequenza genetica di SARS-CoV-2 è stata caricata sulla piattaforma Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID), le aziende e i produttori di sistemi diagnostici hanno rapidamente sviluppato numerosi esami per il rilevamento del nuovo coronavirus (3,9). Attualmente, i test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) sono gli esami di riferimento per la diagnosi di infezioni sospette da SARS-CoV-2 (10). Il consenso degli esperti ha raccomandato di includere almeno due *loci* genici di SARS-CoV-2, al fine di migliorare la sensibilità e la specificità dei saggi molecolari (open reading frame 1a/b, proteina nucleocapside N o proteina envelope E) (8). Inoltre, poiché l'efficienza della reazione di amplificazione può essere diversa per i singoli geni bersaglio, è stato raccomandato di utilizzare procedure analitiche a singolo bersaglio per rianalizzare il campione in questione (8).

A seguito della diffusione mondiale di SARS-CoV-2, le variazioni genomiche del virus a RNA hanno portato alla formazione di molti genotipi distinti dello stesso (11). La sorveglianza a livello genomico di SARS-CoV-2 ha permesso la rapida identificazione di varianti specifiche che possono possedere specifiche mutazioni della proteina spike con evidenze di un aumento della trasmissibilità, della patogenicità e/o della capacità del virus di sfuggire all'immunità anticorpo-mediata. Queste varianti possono quindi destare preoccupazione per la salute pubblica; le varianti di SARS-CoV-2 ritenute più preoccupanti sono state identificate come "Variant of Concern" (VOC) (le cosiddette varianti di preoccupazione) o "Variant Being Monitored" (VBM) (le cosiddette varianti in monitoraggio). La sorveglianza delle VOC è perciò fondamentale, e pertanto, oltre all'analisi molecolare per la rilevazione del tipo di virus, risulta essere importante anche l'identificazione spazio-temporale delle possibili VOC associate al virus stesso.

Per monitorare la qualità e le prestazioni diagnostiche dei nuovi test sviluppati per la diagnosi di SARS-CoV-2, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha incoraggiato i laboratori a partecipare a schemi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ), in conformità al requisito della norma ISO 158189:2012 (12).

Infatti, i programmi di VEQ, come definito da Uldall A. rappresentano "un'attività professionale integrata di garanzia della qualità dei laboratori medici" e devono

essere utilizzati per valutare e migliorare continuamente la qualità analitica dei laboratori medici (5,13).

In questo lavoro vengono presentati i risultati di uno schema sperimentale di VEQ per la diagnostica molecolare di SARS-CoV-2 gestito da INSTAND eV con la collaborazione del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB) per i Laboratori della Regione Veneto.

METODI

Organizzazione del Programma di VEQ

In questo lavoro sono riportati i risultati di 18 campioni di controllo utilizzati nel Programma di VEQ di Instand eV. e distribuiti dal CRB ai laboratori della Regione Veneto, in tre diversi esercizi tra il 2020 e il 2021: 1° esercizio 2020 (1°-2020, distribuito in luglio 2020); 2° esercizio 2020 (2°-2020, distribuito in novembre 2020); 1° esercizio 2021 (1°-2021, distribuito in marzo 2021). Il numero di campioni per ogni esercizio è stato: 7 per il 1°-2020; 6 per il 2°-2020; 5 per il 1°-2021.

I risultati dei laboratori partecipanti e le specifiche inerenti le procedure analitiche utilizzate per la rilevazione molecolare di SARS-CoV-2, sono stati raccolti mediante il sito web del CRB e condivisi con Instand eV.

I risultati relativi ad ogni campione di controllo (espressi come positivo, negativo, indeterminato) sono stati elaborati ed è stato prodotto un rapporto che è stato poi distribuito a tutti i partecipanti che riporta le seguenti informazioni: correttezza della risposta in riferimento alla risposta attesa (cioè la condizione clinica del paziente origine del campione); numero di risultati corretti e numero di risultati non corretti in riferimento ai sistemi analitici utilizzati.

Campioni di controllo

Diciotto campioni di controllo a titolo ignoto forniti dal Nationales Konsiliarlaboratorium für Coronaviren di Berlino, le cui caratteristiche sono riportate nella Tabella 1 e 2, sono stati distribuiti ai laboratori partecipanti. In particolare:

- 10 campioni positivi per SARS-CoV-2, inattivato ed estratto dal surnatante di coltura tissutale (codice campione: 340069, 340073, 340075, 340077, 340079, 340080, 409001, 409002, 409003, 409005);
- 2 campioni negativi per SARS-CoV-2, costituiti da lisato della linea cellulare commerciale MRC-5 (codice campione: 340070, 340076);
- 1 campione negativo per SARS-CoV-2 (codice campione: 409004);
- 5 campioni positivi per altri coronavirus (MERS-CoV, HCoV 229E, HCoV OC43) inattivati ed estratti dal surnatante di coltura tissutale, utilizzati per valutare la specificità del test (codice campione: 340067, 340068, 340072, 340074, 340078).

Inoltre, nel 1° esercizio del 2021, su 4 campioni di controllo (*001, *002, *003, *004), è stata effettuata l'analisi delle VOC mediante sequenziamento e ricerca delle mutazioni puntiformi.

Tabella 1*Caratteristiche dei campioni di controllo distribuiti ai laboratori partecipanti al Programma di VEQ*

Esercizio di VEQ	Campioni	Risultato	Virus	Copie/mL ^a	Origine del campione
1°-2020	*67	Negativo	MERS-CoV (inattivato)	26 646 636	surmatante di culture tissutali
	*68	Negativo	HCoV 229E	NC	surmatante di culture tissutali
	*69	Positivo	SARS-CoV-2 (inattivato)	268 471	surmatante di culture tissutali
	*70	Negativo	MRC-5-cells	0	lisati cellulari
	*72	Negativo	HCoV NL63	NC	surmatante di culture tissutali
	*73	Positivo	SARS-CoV-2 (inattivato)	25 002	surmatante di culture tissutali
	*74	Negativo	HCoV OC43	NC	surmatante di culture tissutali
2°-2020	*75	Positivo	SARS-CoV-2 (inattivato)	231 993	surmatante di culture tissutali
	*76	Negativo	MRC-5-cells	0	lisati cellulari
	*77	Positivo	SARS-CoV-2 (inattivato)	1 024 516	surmatante di culture tissutali
	*78	Negativo	HCoV 229E	NC	surmatante di culture tissutali
	*79	Positivo	SARS-CoV-2 (inattivato)	204 795	surmatante di culture tissutali
	*80	Positivo	SARS-CoV-2 (inattivato)	120 084	surmatante di culture tissutali
1°-2021	*001	Positivo	SARS-CoV-2 no VOC	16 359 064	surmatante di culture tissutali
	*002	Positivo	SARS-CoV-2 VOC B.1.1.7	7 218 064	surmatante di culture tissutali
	*003	Positivo	SARS-CoV-2 VOC B.1.351	6 290 377	surmatante di culture tissutali
	*004	Negativo	Controllo negativo	0	lisati cellulari
	*005	Positivo	SARS-CoV-2 no VOC	1 045 777	surmatante di culture tissutali

^aMedia robusta calcolata sui risultati forniti dai laboratori in accordo all'algoritmo A/DIN ISO 13528/Annex C. NC, non calcolato per il numero limitato di risultati quantitativi trasmessi.

In tutte le Figure (Figure 1-2) e Tabelle (Tabelle 1-5), i codici campione, sono stati abbreviati per esigenze grafiche: da 340067 a *67; da 340068 a *68; da 340069 a *69; da 340070 a *70; da 340072 a *72; da 340073 a *73; da 340074 a *74; da 340075 a *75; da 340076 a *76; da 340077 a *77; da 340078 a *78; da 340079 a *79; da 340080 a *80; da 409001 a *001; da 409002 a *002; da 409003 a *003; da 409004 a *004; da 409005 a *005.

Elaborazione dei risultati

Tutti i risultati raccolti sono stati raggruppati in riferimento al sistema analitico utilizzato e alla tipologia di risposta fornita (positiva, negativa, indeterminata) ed è stato calcolato: il numero di risposte fornite dai laboratori partecipanti; la percentuale di risposte in riferimento al sistema analitico utilizzato e all'esercizio (Figure 1 e 2); la percentuale di risposte in riferimento alla tipologia di risposta e al campione di controllo (Tabelle 3-5).

Valutazione della correttezza dei risultati

La correttezza dei risultati dei laboratori partecipanti è stata valutata sulla base del confronto con la risposta attesa identificata analizzando le caratteristiche del campione (Tabelle 1 e 2).

I risultati relativi all'analisi di sequenziamento e alla ricerca delle mutazioni puntiformi sono stati valutati in accordo ai criteri di inclusione (diverse possibili mutazioni associate alla stessa variante) ed esclusione definiti dall'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), ed è stata considerata corretta la risposta che, confrontata con quella di consenso, presentava meno di 6,6 nucleotidi di differenza per ogni 100 nucleotidi analizzati (Summary of sample properties and target value SARS-CoV-2 VOC March 2021 20210813, Instand document).

RISULTATI

Il numero dei laboratori partecipanti al Programma di VEQ, afferenti al CRB, risulta aumentato dal 1°-2020 (16 laboratori) al 1°-2021 (33 laboratori); aumento che

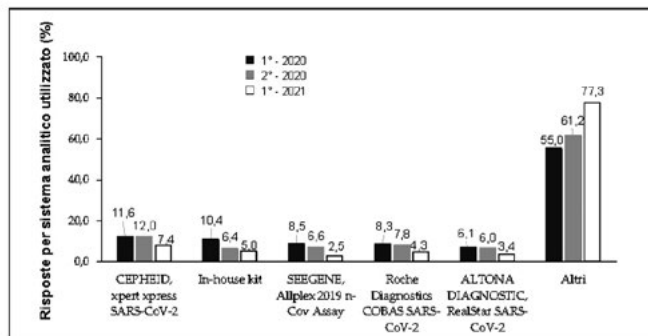


Figura 1
Percentuale di risposte per sistema analitico utilizzato.

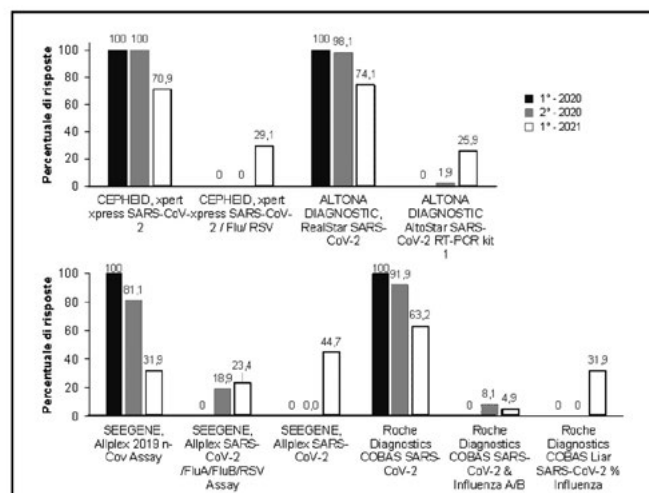


Figura 2
Percentuale di risposte, ottenute con i sistemi analitici maggiormente utilizzati, calcolata in riferimento allo stesso produttore, per esercizio.

Tabella 2

Caratteristiche dei campioni di controllo distribuiti ai laboratori partecipanti al Programma di VEQ per le analisi di sequenziamento e analisi di mutazioni puntiformi

Campioni	Virus	VOC associate	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
*001	SARS-CoV-2 no VOC	Nessuna VOC secondo ECDC	Nessuna mutazione VOC associata	
*002	SARS-CoV-2 VOC B.1.1.7	B.1.1.7	N501Y; N501Y, del H69/V70	E484K
*003	SARS-CoV-2 VOC B.1.351	B.1.351	N501Y; N501Y, E484K; N501Y, K471N, E484K	del H69/V70
*004	Controllo negativo	Negativo	Negativo	

VOC, variants of concern; ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control.

Tabella 3

Percentuale delle diverse tipologie di risultati forniti dai laboratori partecipanti per campione di controllo.

Codice campioni	Tipologia di risposte (%)		
	Positivo	Negativo	Indeterminato
*67	0,4	98,5	1,1
*68	0,8	99	0,2
*69	99,1	0,6	0,2
*70	0,4	99,1	0,4
*72	0,9	98,3	0,8
*73	96,5	2,9	0,6
*74	0,8	98,9	0,3
*75	99,3	0,6	0,1
*76	1,4	98,1	0,5
*77	99,8	0,2	0
*78	0,9	98,6	0,5
*79	99,1	0,7	0,2
*80	99,1	0,6	0,4
*001	99,5	0,3	0,2
*002	97,4	2,5	0,2
*003	99,3	0,7	0
*004	4	95	1
*005	99,2	0,5	0,3

Tabella 4

Percentuale dei risultati scorretti (indeterminati ed errati) forniti dai laboratori partecipanti nei diversi campioni testati nei tre esercizi.

Codice campioni	Tipologia di risposte (%)	
	Errati	Indeterminati
*67	0,4	1,1
*68	0,8	0,2
*69	0,6	0,2
*70	0,4	0,4
*72	1,0	0,8
*73	2,9	0,6
*74	0,8	0,3
*75	0,6	0,1
*76	1,4	0,5
*77	0,2	0
*78	1,0	0,5
*79	0,7	0,2
*80	0,6	0,4
*001	0,3	0,2
*002	2,5	0,2
*003	0,7	0
*004	4,0	1,0
*005	0,5	0,3

Tabella 5

Percentuale dei risultati dell'analisi di sequenziamento (pannello superiore) e dell'analisi delle mutazioni puntiformi (pannello inferiore), per campione di controllo.

Tipologia di risposte dei laboratori	Percentuale di risposte			
	*001	*002	*003	*004
Analisi sequenziamento				
Codice Campione				
Nessuna mutazione associata	86,96	0	0	3,48
Negativo	2,61	0	0	74,78
del H69/V70	1,74	0	0	0
N501Y	0,87	0	0	0
N501Y; del H69/V70; A570D	0	89,57	0	0
D80A; E484K; K4117N; N501Y	0	0	74,78	0
Altre mutazioni	4,35	5,22	6,09	0,87
Nessuna dichiarazione	1,74	1,74	1,74	1,74
Altro nei criteri di inclusione	0	2,61	8,70	0
Altro nei criteri di esclusione	0	0,87	2,61	0
Altro non specificato	0	0	6,09	0
Non effettuato	1,74	0	0	19,13
Analisi mutazioni puntiformi				
Negativo	1,87	0	0,93	77,57
Nessuna mutazione associata	94,39	0	2,80	1,87
b.1.1.7	0	95,33	0	0
B.1.351	0	0	57,01	0
B.1.351 or P.1	1,87	0	33,64	0
Variante generica	0,93	3,74	5,61	0
Non effettuato	0,93	0,93	0	20,56

non rispecchia il numero totale dei laboratori afferenti al Programma Instand eV., considerando il numero di risposte totali riportate nei relativi report di VEQ.

Il numero medio delle risposte agli esercizi del programma di VEQ è risultato essere 927,3 (intervallo 922-945) per il 1°-2020, 844,2 (intervallo 842-846) per il 2°-2020 e 594,4 (intervallo 590-604) per il 1°-2021.

Il numero di risposte dei laboratori risulta diminuito nel tempo con un decremento dell'8,9% tra il 1°-2020 ed il 2°-2020 esercizio e del 35,9% tra il 1°-2020 ed il 3°-2021, percentuali calcolate sulla media delle risposte fra i campioni dello stesso esercizio.

Le principali procedure analitiche, utilizzate

rispettivamente nel 1°-2020, 2°-2020 e 1°-2021 esercizio, sono riportate nella Figura 1. In media si contano 57 produttori diversi nel 1°-2020, 58 nel 2°-2020 e 45 nel 1°-2021.

In seguito al rapido e costante aumento della produzione di nuovi kit diagnostici per la rilevazione di SARS-CoV-2 mediante tecnica molecolare, e lo sviluppo di procedure analitiche migliorative in grado di discriminare l'RNA specifico di SARS-CoV-2 dal β -coronavirus del ceppo B (B- β CoV), si evidenzia la graduale adozione da parte dei laboratori partecipanti di nuovi kit immessi sul mercato dai produttori, a partire dal 2°-2020 (Figura 2). Infatti, per quanto riguarda i sistemi

analitici maggiormente utilizzati, raggruppando i risultati ottenuti con sistemi analitici dello stesso produttore e calcolando la percentuale dei risultati raccolti in ogni esercizio (indipendentemente dal campione) sul numero totale di risultati del primo esercizio, si evidenzia che i laboratori tendono ad adottare il nuovo kit immesso sul mercato.

Nella Tabella 3 è riportata la percentuale delle differenti tipologie di risposte (positivo, negativo, indeterminato) fornite dai laboratori, in riferimento al singolo campione distribuito. In generale, è stata riscontrata una buona concordanza tra i risultati dei laboratori partecipanti, con un intervallo complessivo che varia tra il 95% e il 99,8%.

Nella tabella 4 sono stati riportati risultati valutati come falsi positivi e falsi negativi (0,2% - 4,0%), e come indeterminati (0-1,1%). La percentuale più elevata di quest'ultima tipologia di risultati è associata ai seguenti campioni: *73 (positivo per SARS-CoV-2; la media robusta dei risultati è 25 002 copie/mL) 3,5%; *002 (positivo per SARS-CoV-2, VOC B.1.351; la media robusta dei risultati è 7 218,064 copie/mL) 2,7%; *004 (negativo) 5,0%.

Relativamente alle analisi di sequenziamento e della ricerca delle mutazioni puntiformi effettuate su 4 campioni (*001, *002, *003, *004), 115 laboratori hanno eseguito l'analisi di sequenziamento e 107 laboratori la ricerca delle mutazioni puntiformi. Complessivamente si evidenzia una buona concordanza dei risultati relativi al sequenziamento. In particolare, sono state valutate correttamente: per il campione *001, positivo per SARS-CoV-2 senza mutazioni associate, l'86,96% delle risposte; campioni *002 e *003, positivi per SARS-CoV-2 con mutazioni presenti all'interno dei criteri di inclusione, l'89,57% e il 74,78% delle risposte rispettivamente; campione *004, negativo per SARS-CoV-2, il 74,78% delle risposte (Tabella 5).

Analogamente, per quanto riguarda l'analisi delle mutazioni puntiformi si evidenzia una buona concordanza tra i risultati dei partecipanti: rispettivamente 94,39% delle risposte per il campione *001; il 95,33%, per il campione *002; il 90,65% (comprensivo dei risultati nei criteri di inclusione) per il campione *003. Per il campione *004, solo il 79,44% lo ha identificato come negativo o con nessuna mutazione associata mentre il 20,56% non ha effettuato l'analisi. Nel complesso, è stata riscontrata una percentuale di errore nell'identificazione delle mutazioni puntiformi con un intervallo che varia dal 0,93% al 5,61% (Tabella 5).

DISCUSSIONE

La partecipazione dei laboratori ai programmi di VEQ è un'attività necessaria per acquisire informazioni utili e affidabili che consentano di valutare e monitorare nel tempo l'idoneità dei sistemi diagnostici utilizzati, l'affidabilità dei risultati e la qualità delle procedure interne adottate. I risultati riportati in questo lavoro evidenziano una diminuzione del numero di risposte raccolte dal primo all'ultimo esercizio (8,9% in meno dal primo al secondo esercizio e 35,9% in meno dal primo al terzo esercizio) probabilmente conseguente ad un inferiore numero di laboratori partecipanti al Programma

Instand eV, che potrebbe essere dovuto ad una migliore strategia organizzativa basata sulla razionalizzazione e riallocazione delle risorse da parte delle istituzioni per fronteggiare la congiuntura pandemica. Si evidenzia, inoltre, la progressiva adozione di sistemi analitici con migliori prestazioni contestualmente alla loro disponibilità sul mercato e la sostituzione dei sistemi sviluppati *in house* con sistemi commerciali. Infatti, durante l'epidemia da SARS-CoV-2, la ricerca diagnostica ha permesso l'introduzione sul mercato di sistemi analitici con caratteristiche via via migliorative in grado di discriminare tra l'RNA specifico del lignaggio B betacoronavirus (B-βCoV) e SARS-CoV-2 inducendo i laboratori al loro utilizzo. Si osserva, in particolare nel 1°-2021 esercizio, che la percentuale di procedure analitiche sviluppate *in house* si è ridotta a circa la metà (da 10,4% a 5%) mentre è aumentato l'utilizzo di sistemi analitici dei differenti produttori (dal 55% al 77,3%), raggruppati nella categoria "altri", a dimostrazione dei numerosi sistemi diagnostici immessi sul mercato da diversi produttori (Figura 1).

La concordanza tra i risultati forniti dai laboratori partecipanti può ritenersi, in linea generale per tutti i campioni di controllo, soddisfacente (>95%). La percentuale maggiore di risultati scorretti riscontrati a carico dei campioni *73 (3,5%), *002 (2,7%) e *004 (5,0%) non sembra imputabile a particolari caratteristiche del campione, a parte per il campione *73 per il quale si riscontra una bassa carica virale, e che potrebbe essere dovuta a errori nella fase preanalitica, in particolare legati a problemi di manipolazione del campione, come riportato in diversi articoli già pubblicati (14-16), o nella fase post-analitica, in particolare l'interpretazione dei risultati dei test di laboratorio (15). Tuttavia, la segnalazione del risultato errato ha indotto i laboratori coinvolti ad indagare le possibili cause di errore ed a implementare le azioni di miglioramento necessarie; nell'esercizio successivo infatti (risultati non descritti in questo lavoro), questi laboratori hanno ottenuto prestazioni soddisfacenti.

Nel complesso, lo schema sperimentale VEQ, riportato in questo lavoro, ha mostrato risultati soddisfacenti, concordemente ai risultati relativi ad altri schemi di VEQ per i test molecolari SARS-CoV-2 riportati in letteratura (15,17). In particolare, per i laboratori della Regione Veneto afferenti al CRB, ogni prestazione analizzata è risultata essere concorde al risultato atteso.

In conclusione, i risultati dimostrano che la VEQ è uno strumento prezioso per i laboratori per valutare le proprie prestazioni in confronto a quelle di altri laboratori, a livello nazionale ed internazionale, e per identificare eventuali opportunità di miglioramento. Inoltre, nel particolare contesto pandemico in cui molti sistemi analitici sono stati immessi sul mercato velocemente e con autocertificazione, la VEQ è stata, ed è, indispensabile per valutare le prestazioni dei sistemi in commercio ed individuare quelli diagnosticamente più affidabili.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:141–54.
2. Bohn MK, Mancini N, Loh TP, et al. IFCC Interim guidelines on molecular testing of SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1993–2000.
3. Eftekhari A, Alipour M, Chodari L, et al. A comprehensive review of detection methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms* 2021;9:232.
4. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater* 2021;20:593–605.
5. Sciacovelli L, Padoan A, Secchiero S, et al. Serological diagnostic for SARS-CoV-2: an experimental External Quality Assessment Scheme. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1878–84.
6. Dorigatti I, Lavezzo E, Manuto L, et al. SARS-CoV-2 antibody dynamics and transmission from community-wide serological testing in the Italian municipality of Vo'. *Nat Commun* 2021;12:4383.
7. Padoan A, Zuin S, Cosma C, et al. Clinical performances of an ELISA for SARS-CoV-2 antibody assay and correlation with neutralization activity. *Clin Chim Acta* 2020;510:654–5.
8. Yang Z, Wu J, Ye F, et al. Expert consensus-based laboratory testing of SARS-CoV-2. *J Thorac Dis* 2020;12:4378–90.
9. <https://www.finddx.org/covid-19/tests/> (ultimo accesso: gennaio 2022)
10. Carter LJ, Garner L V., Smoot JW, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent Sci* 2020;6:591–605.
11. Rambaut A, Holmes EC, O'toole Á, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology Europe. *Nat Microbiol* 2020; 5:1403–7.
12. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501> (ultimo accesso: gennaio 2022)
13. Uldall A. Origin of EQA programmes and multidisciplinary cooperation between EQA programme organizers within laboratory medicine. *EQA News* 1997;8:1-27.
14. Lippi G, Simundic A-M, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1070–6.
15. Plebani M. Laboratory medicine in the COVID-19 era: six lessons for the future. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1035–45.
16. Tang Y-W, Schmitz JE, Persing DH, et al. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol* 2020;58:512-20.
17. Matheeußen V, Corman VM, Donoso Mantke O, et al. International external quality assessment for SARS-CoV-2 molecular detection and survey on clinical laboratory preparedness during the COVID-19 pandemic, April/May 2020. *Euro Surveill* 2020;25: 2001223.

Modello organizzativo di gestione decentrata della terapia anticoagulante orale nella ULSS 6 Euganea

Elisa Gnatta, Roberto Ghirardo, Valeria Temporin, Anna Maria Leo

UOC Medicina di Laboratorio Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta" Monselice (Padova-Italy)

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso Nazionale SIBioC, 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, sotto forma di Comunicazione Orale

ABSTRACT

Organisational model for the local management of oral anticoagulant therapy in the "ULSS 6 Euganea".

Introduction: Point of Care portable coagulometers (POCT-INR) allow to shift determination of prothrombin time (PT-INR) from central laboratory to local health facilities. In a broad and complex territory, determining PT-INR in decentralized offices is a key objective for the monitoring of the therapy and patient's life quality improvement. Aim of the study is the description of the organizational model for decentralized management of patients in Oral Anticoagulant Therapy. **Methods:** starting from October 2020, a bidirectional connection was implemented between Laboratory Information System (LIS) of the Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta" Monselice (Padova, Italy) and peripheral offices, where clinical data are collected and PT-INR determined by POCT-INR (by CoaguChek® Roche Diagnostics, Germany). Results are sent in real time to central laboratory where data are validated and stored. Data can be consulted and downloaded like any other laboratory test. **Results:** the project involved 2 980 patients. Peripheral centres are located throughout the territory of ULSS 6 Euganea, with 81 POCT-INR instruments for around 60 000 determinations per year with an average of 7.4 INR measurement per patient. Around 2% of these INR showed a value >5 (critical value) and have been immediately communicated by the POCT manager to the physician in charge of the therapy. For two patients with polycythemia vera it was impossible to have an INR value measured by the POCT because of the high value of the hematocrit and a venous blood collection was necessary. The POCT instruments analytical performances are verified by the POCT manager, using an internal quality control program; regular reports are sent to the pertinent local facility. **Conclusions:** the connection with LIS represents the project's focal point, allowing data storage, making them available at any time for any connected facility. This model simplifies the management of patients allowing easier access to the determination of PT-INR, with more constant therapy control and significant improvement of the patients' quality of life without jeopardizing the patients' safety.

Parole chiave: Point of Care Testing, terapia anticoagulante orale, coagulometri portatili

INTRODUZIONE

Verso la fine degli anni 60, la terapia anticoagulante orale (TAO) con i farmaci anti-vitamina K (AVK) è stata diffusamente utilizzata per la profilassi antitrombotica primaria e secondaria nel tromboembolismo venoso, embolia polmonare, fibrillazione atriale e nei portatori di protesi valvolari cardiache (1). Si stima che in Italia i pazienti in TAO con AVK, in particolare con warfarina, siano oltre un milione, pari al 1,5-2% della popolazione generale (2). Nonostante l'introduzione di nuovi anticoagulanti orali ad azione diretta (DOAC), la

warfarina rimane il farmaco antiacogulante orale più comunemente prescritto in tutto il mondo. Il principale problema legato all'uso di questa terapia è l'elevata variabilità inter ed intra-individuale della risposta biologica al farmaco in funzione di condizioni genetiche, interferenze farmacologiche, dieta e suo assorbimento (3-4).

L'identificazione dell'intervallo terapeutico ottimale e la standardizzazione dell'espressione dei risultati del tempo di protrombina [International Normalized Ratio (PT-INR)] (5) hanno avuto ed hanno un'estrema importanza in termini di efficacia e sicurezza. Il controllo periodico

Corrispondenza a: Elisa Gnatta, UOC Laboratorio Analisi ULSS 6 Euganea Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta" Via Albere, 30 Monselice (PD)

Ricevuto: 29.12.2022

Revisionato: 20.01.2022

Accettato: 22.02.2022

Pubblicato on-line: 11.03.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.012

del PT-INR è necessario durante tutto il corso della TAO; l'intervallo terapeutico è considerato ottimale se i valori di PT-INR rientrano tra 2,0 e 3,0 per la maggior parte delle indicazioni al trattamento dell'AVK (1). I pazienti devono, quindi, sottoporsi a controlli periodici per la durata della terapia, spesso per tutta la vita, idealmente ogni 3-4 settimane o anche meno.

Il monitoraggio della TAO può essere condotto presso Centri di Sorveglianza della Terapia Anticoagulante (CSA), o presso Medici di Medicina Generale (MMG) e prevede la preliminare misura del PT-INR. Il monitoraggio periodico comporta quindi un disagio per i pazienti e l'utilizzo di coagulometri portatili Point of Care Testing (POCT-INR) per l'esecuzione del PT-INR, può fornire un aiuto significativo nella gestione di questa terapia permettendo ai pazienti di eseguire l'esame al proprio domicilio in autonomia o con l'ausilio infermieristico dell'Assistenza Domiciliare Integrata (ADI) o presso le Medicine di Gruppo Integrate (MGI). L'utilizzo dei POCT-INR inoltre è risultato efficace in termini di beneficio clinico in quanto i pazienti mostrano una maggior aderenza al trattamento con conseguente riduzione degli effetti avversi quali sanguinamenti o ictus (6-7).

L'avanzamento tecnologico applicato alla determinazione del PT-INR ha determinato lo sviluppo di POCT-INR affidabili ed efficaci, soprattutto quelli di ultima generazione; solitamente di piccole dimensioni, leggeri, maneggevoli e facilmente trasportabili, consentono l'esecuzione del PT-INR mediante un prelievo di sangue capillare (8-9). L'accuratezza del PT-INR ottenuto tramite diversi POCT-INR, quando confrontata con la misura ottenuta con i coagulometri automatizzati del laboratorio centralizzato, non è costante all'interno di tutto l'intervallo di misura: è stata dimostrata una buona concordanza nei valori nell'intervallo terapeutico tra 2 e 3,5 mentre la discordanza aumenta all'aumentare del valore di INR (10-11). Tuttavia alcuni lavori hanno dimostrato ottimi fattori di correlazione tra le due misure con valori fino all'85-90% di concordanza (10-11). Inoltre, il PT-INR determinato con il POCT-INR porta nel 66-78% dei casi alla stessa decisione terapeutica che si sarebbe presa basandosi su un PT-INR misurato in laboratorio (12).

Questi strumenti diagnostici possono essere tanto utili quanto associati a rischi rilevanti: il loro governo e la supervisione di tutto il processo mediante la connettività in rete sono necessari per evitare gravi conseguenze per la sicurezza dei pazienti (13). La connettività, infatti, consente che gli strumenti siano controllati e gestiti centralmente da personale qualificato e facilita lo scambio di informazioni in modo sicuro e tracciabile dal sito remoto al laboratorio centrale e al sistema informativo ospedaliero (14).

L'obiettivo del progetto descritto nel presente lavoro era finalizzato alla connessione al Laboratory Information System (LIS) del Laboratorio Analisi degli Ospedali Riuniti Padova Sud di Monselice (PD) di tutti i POCT-INR presenti sul territorio della ULSS 6 Euganea per permettere di spostare la fase di monitoraggio del PT-INR dal laboratorio centrale alle strutture sanitarie periferiche della provincia di Padova. La numerosità

degli strumenti presenti su tutto il territorio padovano aveva, infatti, reso necessaria una gestione organizzata e strutturata con una supervisione e gestione da parte del laboratorio centrale.

METODI

Estensione della ULSS 6 Euganea

L'Azienda ULSS 6 Euganea è la più grande Azienda Sanitaria del Veneto. È nata nel 2016 dalla fusione delle ULSS 15, 16 e 17. L'ambito territoriale che ricopre è costituito dai 101 Comuni della provincia di Padova con una popolazione di circa 936 000 abitanti. Il territorio è diviso in 5 Distretti Socio Sanitari che garantiscono i servizi di livello primario e costituiscono il polo di integrazione tra i servizi sanitari, socio-sanitari e sociali. La dislocazione territoriale dei 5 distretti è rappresentata in Figura 1.

Strutture coinvolte

Coordinatore del progetto è il Laboratorio Analisi degli Ospedali Riuniti Padova Sud di Monselice (PD). Le sedi periferiche coinvolte sono 17, elencate nella Tabella 1 e includono il CSA presente presso l'Ospedale dei Colli di Padova, 7 ADI e 9 MGI. Il distretto 4 non risulta incluso nel progetto in quanto non sono attualmente presenti in quel territorio strumenti POCT-INR.

Coagulometri portatili

La determinazione del PT-INR avviene su prelievo di sangue capillare mediante l'uso di coagulometri portatili CoaguChek® (Roche Diagnostics, Milano) tipo XS Pro e XS Pro II che vengono settimanalmente sottoposti a controlli di qualità per valutarne la precisione (15).

I controlli di qualità interni, forniti dalla ditta, sono su due livelli per CoaguChek® XS Pro II e su un livello per CoaguChek® XS Pro. Il dirigente medico del laboratorio analisi responsabile dei POCT (POCT Manager) supervisiona i risultati dei controlli di qualità mediante il middleware Cobas IT1000 e fornisce un resoconto quadrimestrale (su circa 20 punti) contenente il CV% e il bias% per ogni strumento con valutazioni conclusive ed eventuali suggerimenti migliorativi. La frequenza settimanale dei controlli di qualità è stata stabilita e tarata sul carico di lavoro e sulla stabilità dei materiali, in condizioni di operatività non continuative.

La valutazione dell'accuratezza, in un sistema così ampio e complesso, è estremamente complicata; per risolvere questa carenza, si sta attualmente valutando la partecipazione a un programma VEQ che prevede l'esecuzione dell'esercizio su almeno un dispositivo per ogni sede periferica e un successivo allineamento analitico tra gli altri strumenti della stessa sede.

Fasi del progetto

Il progetto è stato suddiviso in due fasi: la prima è iniziata a ottobre 2020 e ha visto coinvolti i distretti 1, 2, 3. Inizialmente è stato installato presso il CSA un



Figura 1

Provincia di Padova suddivisa nei 5 distretti socio-sanitari. I distretti dell'ex ULSS 16 ricoprono il territorio centrale della provincia di Padova e sono il distretto 1, 2, 3 (rispettivamente Padova Bacchiglione, Padova Terme Colli, Padova Piovese). Il distretto 4 dell'ex ULSS 15 ricopre il territorio dell'Alta Padovana e il distretto 5 dell'ex ULSS 17 ricopre il territorio Padova Sud.

nuovo gestionale per la TAO adottando il software GESTAO® (Tesigroup, Milano) e successivamente si è provveduto all'interfacciamento con il LIS del laboratorio analisi di Monselice. In questo modo il CSA riceve in tempo reale i risultati dei PT-INR eseguiti sia su sangue venoso e processati presso il laboratorio, sia su sangue capillare ed eseguiti sui strumenti POCT-INR presenti nei tre distretti. A febbraio 2021 è terminata la prima fase del progetto con la connessione di 41 strumenti al middleware Cobas IT 1000 del laboratorio centrale.

A marzo 2021 è iniziata la seconda fase del progetto che ha visto coinvolto il distretto 5 Padova Sud; qui erano presenti numerosi POCT-INR ma non vi era alcuna supervisione e controllo da parte del laboratorio. Inizialmente è avvenuta la mappatura di tutti gli strumenti presenti sul territorio e successivamente si è provveduto alla formazione dei MMG e del personale infermieristico per la prescrizione, l'accettazione e l'esecuzione del PT-INR. In questo territorio non è presente un CSA, quindi la gestione della TAO è esclusivamente in carico al MMG. Terminata la fase di addestramento si è provveduto alla connessione dei 40 strumenti CoaguChek® al middleware Cobas IT 1000 del laboratorio centrale.

RISULTATI

Il progetto coinvolge attualmente 2 986 pazienti con circa 60 000 determinazioni/anno e 42 operatori sanitari. In tutto il territorio della ULSS6 Euganea sono presenti 81 strumenti CoaguChek® (73 XS Pro II, 8 XS Pro) distribuiti nelle diverse sedi periferiche. La Tabella 1 riassume la distribuzione degli strumenti nelle diverse strutture e la numerosità dei pazienti seguiti. Nel corso del primo semestre 2021, per ogni paziente, si sono effettuate in media 7,4 determinazioni.

La Figura 2 schematizza la struttura del modello organizzativo per i POCT-INR della ULSS 6 Euganea. Il LIS di laboratorio rappresenta il punto centrale del progetto: è stato implementato un collegamento bidirezionale tra il LIS e le sedi periferiche dove avviene la prescrizione e la raccolta dei dati clinici da parte dei MMG o dei medici del CSA, l'accettazione da parte del personale amministrativo e la determinazione del PT-INR da parte del personale infermieristico. Le informazioni vengono inviate in tempo reale al laboratorio centrale di Monselice mediante middleware Cobas IT1000.

Tabella 1

Distribuzione dei coagulometri decentrati (POCT-INR) nei distretti del territorio dell'ULSS 6 Euganea e numerosità dei pazienti seguiti

Distretto	Sede	N. strumenti POCT-INR	N. Pazienti
1 Padova Bacchiglione	CSA Ospedale dei Colli	1	663 (22,2%)
	ADI Temanza	16	
	MGI Saonara	2	
	MGI Limena	3	
Totale		22	
2 Padova Terme Colli	ADI Selvazzano	7	284 (9,5%)
	MGI Tencarola	2	
	Totale		9
3 Padova Piovese	ADI Voltabarozzo	6	730 (24,5%)
	MGI Guizza	2	
	MGI Maserà	2	
	Totale		10
5 Padova Sud	ADI Este	5	1309 (43,8%)
	ADI Montagnana	3	
	ADI Conselve	3	
	ADI Monselice	5	
	MGI Due Carrare	4	
	MGI Este	7	
	MGI Conselve	7	
	MGI Pernumia	6	
Totale		40	
Totale globale	17	81	2986

MGI: Medicina di Gruppo Integrata, ADI: Assistenza Domiciliare Integrata, CSA: Centro di Sorveglianza della terapia Anticoagulante.

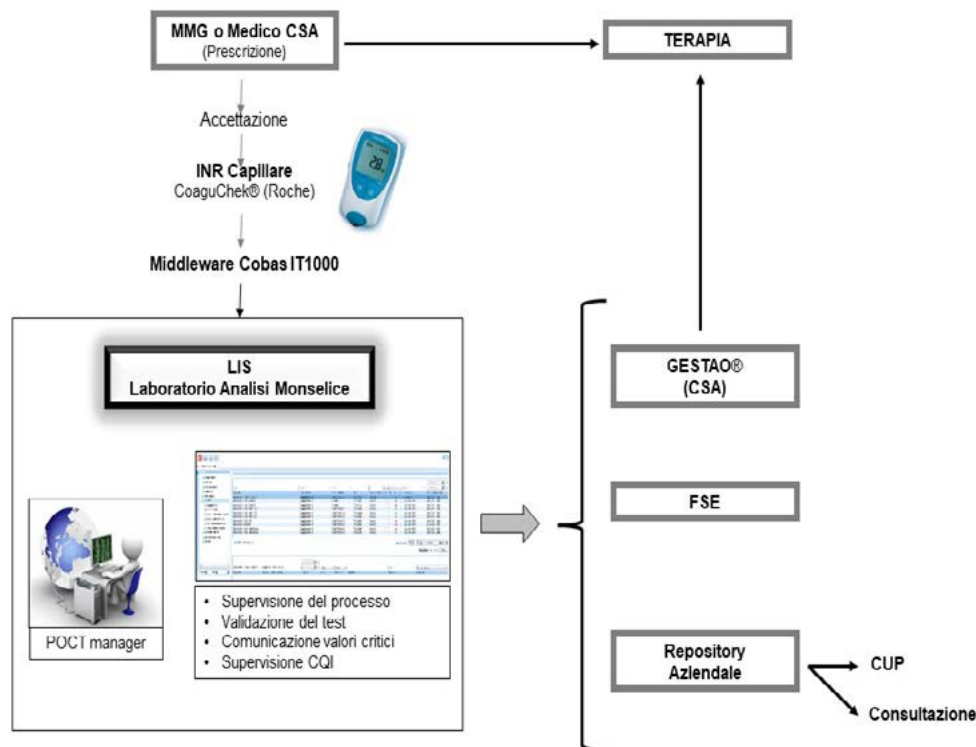
Il dato storicizzato:

- viene inviato al software di monitoraggio TAO se il paziente è seguito dal CSA e la terapia viene gestita dal medico specialista da remoto;
- può essere consultato dal paziente o dal MMG nel Fascicolo Sanitario Elettronico (FSE) e scaricabile come qualsiasi altro esame di laboratorio;
- viene inviato al repository aziendale: può essere consultabile e disponibile in qualsiasi momento e presso qualsiasi struttura collegata con il LIS (ad esempio reparti ospedalieri in caso di ricovero del paziente) e dal sistema gestionale del CUP (Centro Unico di Prenotazione) per gli adempimenti

amministrativi.

Il POCT Manager operando da remoto è in grado di supervisionare tutto il processo:

- verifica l'esecuzione periodica dei CQI con resoconti quadrimestrali;
- ha la possibilità di inibire in tempo reale e da remoto l'utilizzo dello strumento quando si verificano eventuali non conformità;
- verifica le non conformità rilevate e dà indicazioni sulle eventuali azioni correttive da adottare;
- provvede alla validazione del dato e alla comunicazione dei valori critici mediante contatto telefonico con il curante. Nel corso del primo semestre

**Figura 2**

Modello organizzativo di gestione dei coagulometri decentrati presenti nell'ULSS 6 Euganea. Il LIS di laboratorio rappresenta il punto centrale del processo. La supervisione del POCT manager mediante il middleware Cobas IT 1000 permette un controllo di tutto il processo da remoto. I risultati passano dal LIS al gestionale TAO (Gestao), al Fascicolo Sanitario Elettronico (FSE) del paziente e al Repository Aziendale consultabile da qualsiasi struttura collegata con il LIS e dal CUP (Centro Unico di Prenotazione).

2021 sono stati comunicati con questa modalità, gli INR con valore >5 (il 2% circa di tutti gli POCT-INR eseguiti).

Il referto che viene prodotto è del tutto simile a qualunque altro referto di laboratorio: sono ben specificati la sede periferica in cui è avvenuto il prelievo, data e ora del prelievo e del rilascio del referto, è esplicitato che si tratta di matrice capillare ed inoltre viene espresso chiaramente che l'INR è stato eseguito con strumentazione POCT (16).

Criticità e non conformità

Entrambe le fasi si sono espletate in piena pandemia da SARS-CoV-2 e questo ha reso tutto il progetto particolarmente critico e difficoltoso.

Durante la prima fase del progetto la criticità maggiormente riscontrata è stata di tipo informatico in quanto i valori di PT-INR in molti casi non venivano trasmessi al middleware e di conseguenza al LIS. Queste problematiche hanno visto il coinvolgimento di tecnici informatici e di specialisti della ditta fornitrice che hanno

cooperato per la soluzione del problema.

Prima della messa a punto della seconda fase del progetto, gli operatori del distretto 5 eseguivano il POCT-INR senza prescrizione e accettazione e il dato prodotto dallo strumento veniva comunicato al medico verbalmente. È ben noto che questa modalità di azione, apparentemente rapida e comoda, è soggetta a un elevato numero di errori pre e post-analitici che mettono a rischio l'intera procedura e la sicurezza del paziente. La criticità riscontrata in questa seconda fase del progetto è stata di tipo formativo ovvero è stato necessario ri-educare gli operatori sulla corretta procedura e sull'importanza di avere un dato certificato, controllato e supervisionato dal laboratorio. Inoltre, i controlli di qualità venivano eseguiti solo al cambio del lotto delle strisce reattive e senza alcuna supervisione da parte di personale specializzato.

La fase di formazione è stata condotta dal POCT manager coadiuvato dagli specialisti della ditta fornitrice: prima di connettere tutti gli strumenti al LIS, sono stati tenuti incontri con gli operatori coinvolti (medici, infermieri, coordinatori dei distretti) durante i quali sono state condivise e discusse le nuove procedure operative.

In una sola MGI è stato necessario reiterare la formazione contattando personalmente gli operatori illustrando loro l'importanza di seguire scrupolosamente le procedure.

Durante tutta la messa a punto del progetto non è stato necessario bloccare o inibire temporaneamente alcuno strumento: i CQI al di fuori dell'intervallo previsto sono sempre stati immediatamente ripetuti dall'operatore e superati, evidenziando che le problematiche di mancato superamento del CQI erano probabilmente dovute ad una errata operatività. I blocchi strumentali per malfunzionamento hanno interessato solamente due strumenti e sono stati gestiti dalla ditta fornitrice con la rapida sostituzione degli strumenti stessi.

Alcune difficoltà si sono riscontrate con due pazienti affetti da Policitemia Vera: in entrambi i casi lo strumento rilevava un "errore di misurazione" probabilmente dovuto al valore di ematocrito superiore a 0,60 L/L ed è stato necessario eseguire un prelievo venoso inviandolo in laboratorio centrale.

DISCUSSIONE

La crescente necessità di ottenere informazioni diagnostiche o terapeutiche precoci e rapide, assieme al monitoraggio continuo dello stato di salute del paziente in diversi ambiti di cura territoriali (Case della Salute, Case di Riposo, ambulatori medici, farmacie) (17) impone lo sviluppo di tecnologie diagnostiche che possano supportare tale esigenza al di fuori del laboratorio centrale e vicino al sito di cura del paziente.

L'attuale crisi pandemica di SARS-CoV-2 ha messo in evidenza la necessità di una stretta collaborazione e comunicazione tra servizi territoriali, MMG e ospedale; tale collaborazione è stata rafforzata anche grazie all'implementazione delle ADI e delle MGI come servizi di connessione tra territorio e ospedale. L'utilizzo di sistemi POCT in questo ambito (collegati in rete al laboratorio centrale) rappresenta una tecnologia solida, in continuo e rapido sviluppo che contribuisce a consolidare questa collaborazione creando un network in grado di meglio rispondere ai bisogni assistenziali e alla razionalizzazione delle risorse umane ed economiche.

La decentralizzazione della TAO, utilizzando POCT-INR, presenta numerosi vantaggi (18):

- riduce in maniera significativa problematiche quali il sovraccollamento dei centri CSA e limita gli spostamenti e gli assembramenti nei punti prelievi centralizzati (19);
- permette l'invio del dato di PT-INR al medico direttamente dal domicilio del paziente oppure al rientro in sede dell'infermiere che quindi non è più costretto al rispetto dei tempi di invio dei campioni al laboratorio centrale;
- la disponibilità del risultato in tempo reale permette anche l'eventuale ripetizione del prelievo evitando il ritorno dell'infermiere al domicilio del paziente. Questo costituisce un sistema flessibile e più consona alle esigenze del paziente con il miglioramento della qualità del monitoraggio e la riduzione delle complicanze;

- conoscere immediatamente il risultato dell'esame evita ritardi ed errori nella trasmissione del risultato e nella decisione terapeutica. Valutare il risultato insieme al paziente è poi rassicurante sia per il medico che per la persona in trattamento (20).

Il punto fondamentale del processo di decentralizzazione della TAO mediante POCT-INR è il controllo reale da parte del laboratorio centrale con un costante e stretto monitoraggio, supervisione e gestione del sistema. Il collegamento con il LIS rappresenta il fulcro del progetto perché consente di storicizzare il dato e quindi renderlo consultabile e disponibile in qualsiasi momento e presso qualsiasi struttura collegata con il LIS stesso.

La terapia viene gestita dal Medico Specialista del CSA da remoto con l'ausilio di un software per la gestione della TAO o dal MMG con visualizzazione del dato sul FSE; in entrambi i casi ciò avviene grazie al collegamento con il LIS.

L'innovazione tecnologica in termini di POCT ha raggiunto un livello tale da garantire prestazioni analitiche sovrapponibili a quelle ottenute dalle strumentazioni dei laboratori e questo ha permesso di non avere fermi strumentali o non conformità dovute al mancato superamento dei controlli di qualità. Tuttavia, la dimensione tecnologica dell'analizzatore da sola non basta: le criticità riscontrate sono state numerose e hanno riguardato soprattutto gli aspetti informatici e di formazione del personale durante un momento storico complesso come quello pandemico. La stretta e sincronizzata collaborazione di tutti gli attori coinvolti nel progetto (POCT manager, personale informatico dei sistemi informativi dell'ULLS 6 Euganea e del LIS, personale sanitario e specialisti della ditta fornitrice) ha comunque permesso di sviluppare il progetto con soddisfazione e nei tempi previsti.

Il progetto si sviluppa in un territorio estremamente vasto, con un'elevata numerosità di strumenti e, non per ultimo, con risorse umane limitate; tutto ciò rende critica l'organizzazione di un programma VEQ o di allineamento degli strumenti con il laboratorio centrale che rimane comunque la sfida futura che verrà affrontata nei prossimi mesi per concludere la realizzazione dell'intero progetto.

In conclusione, un modello così strutturato semplifica la gestione sia dei pazienti in ADI che dei pazienti afferenti alle MGI permettendo un più agevole accesso alla determinazione del PT-INR con un più costante controllo della terapia e un miglioramento significativo della qualità di vita. Questa gestione presenta diversi vantaggi sia per il paziente che per il medico rappresentando un buon compromesso tra complessità di gestione, efficienza e sicurezza clinica del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, et al. Oral anticoagulant therapy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2012;141:e44S-88S.

2. The Medicines Utilisation Monitoring Centre. National Report on Medicines use in Italy. Year 2019. Rome: Italian Medicines Agency, 2020. <https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1205984/rapporto-osmed-2019.pdf> (ultimo accesso: gennaio 2022).
3. Ansell J, Hirsh J, Poller L, et al. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:S204-33.
4. Pengo V, Zamboni C-F, Fogar P, et al. A randomized trial of pharmacogenetic warfarin dosing in naive patients with non-valvular atrial fibrillation. *PLoS ONE* 2015 10(12):e0145318.
5. Kirkwood TB. Calibration of reference thromboplastins and standardization of the prothrombin time ratio. *Thromb Haemost* 1983;49:238-44.
6. Jackson SL, Peterson GM, Vial JH, et al. Improving the outcomes of anticoagulation: an evaluation of home follow-up of warfarin initiation. *J Intern Med*. 2004;256:137-44.
7. Jackson SL, Peterson GM, House M, et al. Point-of-care monitoring of anticoagulant therapy by rural community pharmacists: description of successful outcomes. *Aust J Rural Health*. 2004;12:197-200.
8. Tripodi A, Arbini AA, Chantarangkul V, et al. Are capillary whole blood coagulation monitors suitable for the control treatment by international normalized ratio? *Thromb Haemost* 1993;70:921-4.
9. Tripodi A. Prothrombin time international normalized ratio monitoring by self-testing. *Curr Opin Hematol* 2004;11:141-5.
10. Ryan F, O'Shea S, Byrne S. The reliability of point-of-care prothrombin time testing. A comparison of CoaguChek S® and XS® INR measurements with hospital laboratory monitoring. *Int J Lab Hematol* 2010;32:e26-33.
11. Dauphin C, Legault B, Jaffeux P, et al. Comparison of INR stability between self-monitoring and standard laboratory method: Preliminary results of a prospective study in 67 mechanical heart valve patients. *Archiv Cardiovasc Dis* 2008;101:753-61.
12. Shermock KM, Bragg L, Connor JT, et al. Differences in warfarin dosing decisions based on international normalized ratio measurements with two point-of-care testing devices and a reference laboratory measurement. *Pharmacotherapy*. 2002;22:1397-404.
13. Murphy MJ, Paterson JR. Point-of-care testing: no pain, no gain. *QJM: Int J Med* 2001;94:571-3.
14. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Point-of-Care Connectivity; approved standard, 2nd ed. CLSI document POCT01-A2. CLSI Wayne, PA, 2006.
15. Testa S, Paoletti O, Bassi L, et al. A global quality control system to check PT-INR portable monitor for Antivitamin K antagonists. *Int J Lab Hematol* 2015;37:71-8.
16. Rampoldi E, Patrucco G, Casati M, et al. Principi per l'implementazione e la gestione del point-of-care-testing (POCT): indicazioni essenziali. *Biochim Clin* 2021;45:312-26.
17. Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ, et al. Laboratory testing in pharmacies. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:943-53.
18. Barcellona D., Fenu L., Marongiu F. Point-of-care testing INR: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:800-5.
19. Testa S, Paoletti O, Alatri A, et al. TAO: meglio la Medicina di Base o i Centri di Sorveglianza? *RIMeL/IJLaM* 2009;5:160-5.
20. Murray ET, Fitzmaurice DA, Mc Cahon D. Point of care testing for INR monitoring: where are we now? *Br J Haematol* 2004;127:373-8.

Effects of selected preanalytical variables on Dried Blood Spot (DBS) and Volumetric Adsorptive Microsampling (VAMS) based bioanalytical methods for the determination of four β -lactam antibiotics

Francesca Mensitieri¹, Albino Coglianese^{1,2}, Valentina Giudice^{1,3}, Bruno Charlier^{1,4}, Federica De Rosa^{1,3}, Amelia Filippelli^{1,3,4}, Fabrizio Dal Piaz^{1,4}, Viviana Izzo^{1,4}

¹Department of Medicine, Surgery and Dentistry "Scuola Medica Salernitana", University of Salerno, Italy

²Post-Graduate School in Clinical Pathology and Biochemistry, University of Salerno, Italy

³Post-Graduate School in Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Salerno, Italy

⁴University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", Salerno, Italy

Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso SIBioC - 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, sotto forma di Comunicazione Orale

ABSTRACT

Introduction: dose adjustment of antibiotic drugs is fundamental in critically ill patients and newborns, who may experience inadequate exposure of these drugs due to different pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) compared to other patients. Despite the increasing use of microsampling devices such as Dried Blood Spot (DBS) and Volumetric Adsorptive Microsampling (VAMS) in paediatric clinical practice, little is reported on the comparison between these two devices in terms of β -lactam antibiotics quantification.

Methods: a method using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the simultaneous determination of amoxicillin, ampicillin, meropenem and cefadroxil from both DBS and VAMS has been evaluated. More specifically, we investigated the influence of some well-known critical pre-analytical parameters, such as blood haematocrit, blood spot volume and sample recovery approach on the results obtained with DBS-based and VAMS-based analytical methods.

Results: our results show that comparable trueness and precision values can be achieved using both DBS- or VAMS-based methods. However, the latter was not affected by blood haematocrit value, whereas accuracy of the DBS-based approach was influenced by parameters as haematocrit, blood spot approaches (by pipette or hanging drop) and spot recovery procedures (DBS cut or punch). For the β -lactams tested, a significant longer stability was found for samples absorbed on DBS, when samples were stored at 4°C.

Discussion: our data support the use of VAMS as preferable devices for β -lactam determinations, while more attention needs to be devoted to different pre-analytical variables for an accurate DBS quantification.

Key words: TDM, β -lactam antibiotics, microsampling devices

INTRODUCTION

Antibiotics exert their efficacy when circulating levels exceed the minimum inhibitory concentration (MIC) for a target pathogen and, for a defined period in case of time-dependent antimicrobials such as β -lactams (1). If drug levels fall below the effective therapeutic range, patients could experience inadequate exposure to antibiotics that might lead to selection of drug-resistant bacterial subpopulations (1). Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is highly recommended to maintain trough drug concentrations within the effective therapeutic range, especially in children and newborns where drug adsorption, distribution, metabolism, and elimination is different from adults and specific pharmacokinetics (PK)

and pharmacodynamics (PD) studies in these patients are currently lacking (1-7). The evaluation of correct drug concentrations for the paediatric population is critical also because drug dosage is commonly calculated based on adult treatments and only adjusted for body weight or body surface area (5). In addition, the uprising concern regarding the spreading of multidrug resistant strains has boosted new interest in investigating the efficacy of antimicrobial drugs also at higher doses.

Unfortunately, a correct TDM of time-dependent antimicrobials requires large blood volume sampling several times a week, strongly limiting this approach especially in neonates where a maximum of 2.5% of total blood volume/draw or 5% of total blood volume in a 30-day period is recommended (8).

Corresponding author: Viviana Izzo, Department of Medicine, Surgery and Dentistry "Scuola Medica Salernitana", University of Salerno, Italy E-mail: vizzo@unisa.it

Received: 22.11.2021

Revised: 10.01.2022

Accepted: 10.03.2022

Published on-line: 08.04.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.013

Microsampling techniques have been developed to reduce sample volume needed for TDM and other analyses: dried blood spot (DBS) sampling coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is frequently used to detect various biomarkers in newborn screening studies, TDM, or for illicit drug detection (9). However, several technical issues negatively affect DBS sampling accuracy and limit its use for quantitative analyses (9). In particular, the intrinsic difficulty of collecting precise blood volumes and variability of the hematocrit values strongly affect the results obtained by analyzing DBS. Recently, Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) devices have been introduced as a promising sample collection technique for quantitative drug analysis allowing automatic and accurate collection of a fixed blood volume (10 - 20 μ L) directly from a finger prick (10). VAMS could overcome several drawbacks encountered in DBS sampling, including uncertainty of blood volume in sub-punched specimens, hematocrit bias and spot heterogeneity (9, 11-13). Several TDM methods were successfully developed over the years using either DBS or VAMS for monitoring antiepileptic, antitubercular or antipsychotic drugs, and, more recently, monoclonal antibodies (11, 14-17)¹.

Other recent works have described the use of DBS or VAMS methods for the measurement of aminoglycosides, including vancomycin, gentamicin, tobramycin, netilmicin, amikacin (18,19), and β -lactams, such as piperacillin and meropenem (9,20-21). Although VAMS microsampling technique is taking hold in latest years compared to DBS, there is still a limited number of studies that directly compare the two techniques, especially for β -lactams (9,11).

In this study, we developed and validated two analytical methodologies based on the use of DBS or VAMS devices for the simultaneous measurement of four β -lactams [amoxicillin (AMOX), ampicillin (AMP), cefadroxil (CDX), and meropenem (MEM)]. We compared results obtained from these two microsampling devices using the same organic extraction procedure and LC-MS/MS analysis settings, and we evaluated also the effects of pre-analytical sample variables, such as hematocrit, on accuracy of the method. Finally, we monitored short and medium-term storage stability of β -lactam-containing samples, using both microdevices.

METHODS

Chemicals and reagents

Formic acid, ultra-grade water and methanol were from Romil (Waterbeach Cambridge, UK). Antibiotics (AMP, AMOX, MEM, and CDX) were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Reference Standard grade Amoxicillin-d4 was obtained from Cayman Chemical (Michigan, USA). Whatman 903 protein saver filter paper cards DBS devices were from GE Healthcare Ltd (Cardiff, UK). Mitra® Clamshell 10 μ L VAMS devices were from Neoteryx, LLC (Torrance, CA, USA). Whole blood for preparation of quality control (QC) samples and

calibration curves was obtained from healthy volunteers recruited at the Transfusion Medicine Unit, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona" of Salerno after signing informed consent and in accordance with the 2013 Helsinki Declaration (22). Whole blood was collected in BD Vacutainer® tubes containing 2, 2', 2'', 2'''-(Ethane-1,2-diylidinitrilo) tetra acetic acid (EDTA) as anticoagulant.

Instrumentation

Analyses were performed with high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The LC-MS/MS analysis system consisted of an UHPLC (Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography) UltiMate 3000 Dioneex® chromatograph from Thermo-Fisher Scientific™ (Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a binary pump, a refrigerated autosampler and a thermostatted chromatographic column coupled to the TSQ Endura™ mass spectrometer (MS) from Thermo-Fischer Scientific™ (Waltham, Massachusetts, USA), equipped with electrospray ionization (ESI) source and a triple quadrupole analyzer (QqQ).

Stock solutions

Antibiotics and Amoxicillin-d4 (IS) were dissolved in saline solution at a final concentration of 1 mg/mL (stock solution) and stored at -20°C until use. A working solution was prepared by mixing each antibiotic stock in saline solution at a final concentration of 500 μ g/mL. The working solution was prepared in ultra-grade water at a final concentration of 50 μ g/mL. All solutions were stored at -20°C until use.

Chromatography and mass-spectrometry

Chromatographic separation was performed using a Phenomenex Luna Omega C18 column (50 x 2.1 mm; 1.6 μ m particle size) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Compound elution was obtained using a two-component mobile phase: 0.1% formic acid in water (eluent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (eluent B). The following multi-step gradient was optimized: from 0 to 2.2 min 5% B, 2.2 to 2.5 min 20% B, 2.5 to 3.3 min at 90% B, at 3.5 return to initial conditions and equilibration of the column at 5% B up to 4.5 min. Flow rate was 0.4 mL/min and column temperature was 20°C . Injection volume was 5 μ L and all samples were analyzed in triplicate. Mass spectrometric analyses of antibiotics and IS were carried out in multiple reaction monitoring (MRM) and electrospray positive mode. For each analyte, a precursor ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$; m/z) and two products (quantifier and qualifier) were identified by direct infusion of pure molecules (10 μ g/mL in ultra-grade water and methanol, 50/50, v/v): AMOX, 366.3 \rightarrow 114 and 208.1; AMP, 350.2 \rightarrow 106.2 and 191.9; MEM, 384 \rightarrow 141.4 and 339.9; CDX, 364.4 \rightarrow 208 and 114; and IS, 370.4 \rightarrow 354 and 213. Retention time, collision energy, and RF lens values are reported in Figure 1. MS data

¹ The reader is referred to the references included in n. 11 for more details

were acquired using XCalibur and processed with Qual Browser software (v.4.0.27.10; Thermo Scientific).

Sample preparation

Whole blood samples were spiked with antibiotics at different concentrations in the presence of EDTA as anticoagulant. Calibration samples were prepared at the following antibiotic concentrations: 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 25 and 35 µg/mL. QC samples were prepared to obtain different target concentrations of 2 (low QC = LQC), 8 (medium QC = MQC) and 20 (high QC = HQC) µg/mL, respectively. DBS samples were prepared by spotting 20 µL of whole blood on filter paper, that were then air-dried over night at room temperature (RT). Unless otherwise stated, DBS were cut through the edges of blood spots. VAMS samples were arranged by adsorbing 10 µL of whole blood on VAMS tip, air-dried over night at RT. VAMS globous hydrophilic tips were then detached from the handler. Both DBS and VAMS tips were placed in 2 mL tubes and processed using the same extraction protocol.

Sample extraction

After air-drying, DBS and VAMS were placed in 2 mL Eppendorf tubes, 50 µL of ultra-grade water were added, samples were vortexed for 10 seconds and incubated for 10 min in a water-bath at 37°C. Afterwards, 200 µL of 80% methanol were added, samples were vortexed for 30 seconds and sonicated for 10 minutes. Supernatants were then transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and centrifuged for 10 minutes at 4°C and 16 000g in a benchtop Eppendorf microcentrifuge 5415R (Sigma-Aldrich). IS was added to 100 µL of clear extracts to a final concentration of 2 µg/mL. Finally, the extracts were transferred to appropriate vials for analysis.

Analytical procedure validation

The method was validated according to D'Avolio et al. guidelines for analytical procedure validation (23). In particular, the following parameters were evaluated: selectivity, specificity, absence of carry-over, lower limit of detection (LLOD) and quantification (LLOQ), linearity in a range of concentrations from 0.5 to 35 µg/mL, matrix effect (ME), extraction recovery (ER), stability, precision and trueness. Selectivity was assessed using six individual sources of blank whole blood, individually analyzed and evaluated for interference. Absence of interfering components was accepted when the response was less than 20% of the LLOQ for the analyte and 5% for the IS. Specificity was evaluated based on consistency of retention times across runs and the presence of both products (quantifier and qualifier) in a constant ratio (1.6 for AMP; 1.4 for AMOX, 2.5 for MEM and 1.2 for CDX). The LLOD was defined as the lowest concentration at which the analytical test can detect the analyte signal (S), discriminating it from the background noise (N) (LLOD: S/N ≥3). The LLOQ is the lowest concentration at which precision and trueness were within 20% with a peak intensity at least 5 times higher than baseline noise (LLOQ: S/N ≥5). Linearity was evaluated using a 9-point calibration curve, including a zero sample (processed matrix with IS), and using LLOQ as first point of the curve. The potential occurrence of carry-over was assessed by injecting a blank DBS/VAMS-extracted sample (without antibiotics) after a DBS/VAMS-extracted sample at final antibiotic concentration of 35 µg/mL. ER was evaluated for each analyte at three concentrations: LQC, MQC and HQC. ME, defined as modifications in ionization efficiency of target analytes, is caused by the presence of interfering compounds in the matrix co-eluting with the analyzed molecules (13,14). ME was evaluated by spiking three different concentrations of each analyte for

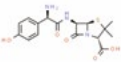
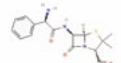
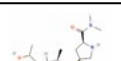

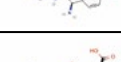
Molecule	Structure	Molecular weight (g/mol)	ESI mode	Precursor (m/z)	Products (m/z)	Retention time (min)	Collision Energy (V)	RF lens
Amoxicillin		365.4	[M±H]	366.3	114	1.02	20	115
					208.1		13	
Ampicillin		394.4	[M±H]	350.2	106.2	1.93	10	139
					191.9		12	
Meropenem		383.4	[M±H]	384	141.4	1.62	14	156
					339.9		10	
Cefadroxil		363.3	[M±H]	364.4	208	1.62	10	128
					114		18	
Amoxicillin d4		369.4	[M±H]	370.4	354	1.02	10	139
					213		12	

Figure 1

Mass spectrometry and chromatography parameters

ESI, electrospray ionization; RF, Rear Focus

DBS (0.16, 0.64 and 1.6 µg/mL) and VAMS (0.08, 0.32 and 0.8 µg/mL) in blank DBS/VAMS-extracted samples or in 64% water/methanol solution (v/v). Precision and trueness were assessed by analyzing LLOQ (0.5 µg/mL), LQC, MQC, HQC and upper limit of quantification (ULOQ) (35 µg/mL) samples on five non-consecutive days, using a two days interval between the different inter-day analyses. Ten replicates of each sample were analyzed to assess the intra-day precision. Stability was evaluated by analyzing QCs in triplicate. Short term and medium-term stability were evaluated at baseline and after 48 hours and 7 days of storage at RT, 4°C, -20°C and -80°C. All experiments were run in triplicate.

Calculations and statistical analysis

Peak areas for each compound were collected using Qual Browser software and results presented as peak area of analyte/IS ratios. Data were analyzed using Prism (v.8.0.1; GraphPad software, Inc., La Jolla, CA). Statistical analyses were performed with R software. For linearity, peak area/IS ratios were plotted against analyte concentrations and linear regression analysis was performed. Slope and correlation coefficient were calculated for each calibration curve. For ER determination, peak areas of each antibiotic were measured from DBS/VAMS-extracted samples spiked with antibiotics before (A) or after (B) extraction. ER was then calculated as (A/B) x 100 (10). For ME evaluation, peak areas of analytes were collected from QCs spiked with antibiotics after extraction (A) or in pure solutions (B), and ME calculated as percentage of (A/B) (10). Intra-day precision (%CV = (SD/Mean) x 100) was considered acceptable when <15%. Trueness was assessed based on % bias estimated as follows:

$$\%bias = [(analytical\ value - theoretical\ value) / theoretical\ value] \times 100.$$

Method imprecision was evaluated by One Way ANOVA. The percent of degradation (%D) for each molecule was calculated as follows:

$$\%D = [(calculated\ concentration\ at\ point\ zero - calculated\ concentration\ at\ day\ n) / calculated\ concentration\ at\ point\ zero] \times 100$$

Where n indicates the day of storage. The acceptance of back-calculated values was ± 15% of theoretical ones.

Hematocrit effect

To evaluate hematocrit effects on accuracy of VAMS- and DBS-based methods, an aliquot of whole blood without manipulation was used for QC preparation (non-corrected, NC); the remaining blood was centrifuged at 3 500g for 10 minutes at +4°C, hematocrit was determined, and volumes of plasma were removed to obtain final hematocrit levels of 40% and 60%. Blood samples were then gently inverted to mix solid and liquid phases, and QCs were prepared as described above.

Influence of spotting and punching method on DBS precision and trueness

To better define the influence of different type of spotting and recovery procedures on DBS-based method accuracy, QCs were prepared at LQC, MQC and HQC concentrations and two different hematocrit values were used (M-HT: “medium” hematocrit –40% and H-HT: “high” hematocrit –60%). Each QC sample was divided in two aliquots which were absorbed on VAMS tips or spotted on DBS, using different spotting and recovery procedures. Briefly, DBS replicates of the same QCs were prepared in two blood samples with M-HT and H-HT, and spotted either by volumetric (20 µL by micropipette) or non-volumetric spotting procedure (hanging drop by using a Pasteur pipette). Each sample set was analyzed by both whole-spot recovery and fixed-diameter punch of blood spot. VAMS and DBS calibration curves were prepared using blood at higher hematocrit value (60%). DBS calibration curve was prepared in duplicate by micropipette spotting. One calibration curve was then analyzed by punching DBS at fixed volume, the other was analyzed by whole-DBS spot recovery. Each calibration curve was then used for quantification of the corresponding set of QCs. Samples were analyzed in triplicate. The final experimental set-up and samples analyzed are detailed in the Results section pertinent paragraph.

RESULTS

Set-up and validation of VAMS and DBS methods

Quantitative analysis of four β-lactams, including AMP, AMOX, MEM and CDX from DBS and VAMS samples was performed by LC-MS/MS after rehydration with ultra-grade water. DBS and VAMS-extracted supernatants were measured in electrospray positive MRM mode, and data were normalized using peak area of the IS. For method validation, whole EDTA K₃E blood spiked with various concentrations of the four antibiotics were prepared and used for QC and calibration.

LLOD and LLOQ were determined for all analytes in samples extracted from DBS and VAMS device (Table 1). No interfering compound was observed for any of the analyzed molecules, regardless of the sampling method. No carry-over was detected by injecting blank samples directly after the analysis of a sample spiked with the highest analyte concentration (35 µg/mL). The linearity of the method appeared to be negligibly affected by the microsampling device used, as for all analytes in the concentration range 0.5 – 35 µg/mL a linear response was observed (Figure 2). Drugs concentration range was selected based on the average therapeutic windows reported for these compounds against different bacterial strains (24).

ER and ME were determined for each analyte for both methods and the results are shown in Table 2. A higher ER was measured for VAMS compared to DBS, as reported elsewhere (9). According to D’Avolio et al. (23),

Table 1

Lower Limit of Detection (LLOD) and Quantification (LLOQ) of β -lactams in Dried Blood Spot (DBS) and Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) devices.

	VAMS	DBS	VAMS	DBS
	LLOD ($\mu\text{g/mL}$)		LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)	
AMPICILLIN	0.05	0.03	0.15	0.10
AMOXICILLIN	0.08	0.05	0.20	0.15
MEROPENEM	0.08	0.08	0.25	0.25
CEFADROXIL	0.08	0.08	0.25	0.25

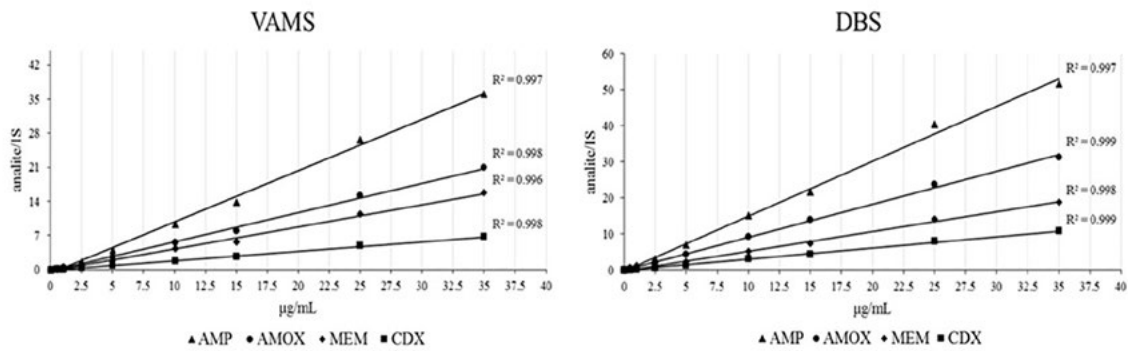


Figure 2

Linearity of the volumetric absorptive microsampling (VAMS) and dried blood spot (DBS) based methodology

Table 2

Extraction Recovery and Matrix Effect expressed as percentage. Three replicate experiments were performed. The percentage bias values were all <5%

% Extraction Recovery								
VAMS				DBS				
$\mu\text{g/mL}$	AMP	AMOX	MEM	CDX	AMP	AMOX	MEM	CDX
2	60	80	35	71	54	55	25	69
8	71	77	38	81	43	41	18	52
20	66	70	39	76	45	38	20	49

% Matrix Effect								
VAMS				DBS				
$\mu\text{g/mL}$	AMP	AMOX	MEM	CDX	AMP	AMOX	MEM	CDX
2	74	91	55	59	91	88	53	70
8	88	95	69	80	91	96	64	82
20	91	100	79	85	112	120	98	106

VAMS, Volumetric Absorptive Microsampling; DBS, Dried Blood Spot; AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil.

ER was acceptable; when ER values below 60% were measured, a percent bias below 5% between 3 replicates was observed. The ME obtained was acceptable for all compounds, as percent CV and bias were within 15% for all analytes at any concentration. Results were similar in both methods, even though a slightly lower ME was found when DBS devices were used. For all analytes and concentrations, percent CV and RSE were <15%.

Results of intra-day and inter-day trueness (% bias) and precision (% CV), carried out for both DBS and VAMS, are shown in Table 3. Both methods were precise in inter- and intra-day quantifications. Trueness also resulted to be comparable for both methods, as bias was <15% for almost all samples analysed.

To assess short- and medium-term stability of samples loaded on DBS or VAMS, the following procedure was carried out. Using whole blood from a single donor,

samples containing 2 µg/mL (LQC), 8 µg/mL (MQC) and 20 µg/mL (HQC) of the different drugs were prepared, spotted on DBS supports or absorbed on VAMS tips, and dried overnight at room temperature (RT). Loaded micro-sampling devices were then stored under different temperatures (RT, 4 °C, -20 °C, -80 °C), for 48 hours and 7 days, before being analyzed. The average degradation percentages observed for each sample stored at different temperature in VAMS and DBS are shown in Figure 3 and 4, respectively.

Our data showed that analytes degradation was negligible in almost all samples stored at -20°C and -80°C for 48 hours, in both VAMS and DBS devices; only for AMP a limited degradation (lower than 10%) was recorded. Conversely, degradations between 30 and 40% were observed when devices were stored at RT. Intriguingly, for refrigerated storage (4°C) higher analytes

Table 3

Precision and trueness measurements for Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) and Dried Blood Spot (DBS).

		TRUENESS (% BIAS)							
		VAMS				DBS			
QCs	(µg/mL)	AMP	AMOX	MEM	CDX	AMP	AMOX	MEM	CDX
LLOQ	0,5	-5,1	3,5	-7,8	16,3	6,5	1,7	-8,7	19,4
LQC	2	-8,5	-4,1	-6,0	11,5	7,4	6,1	-3,6	13,2
MQC	8	-11,4	-12,6	-6,9	6,1	-0,3	-3,9	-4,9	12,2
HQC	20	-13,3	-10,6	-5,9	-0,1	1,6	-3,5	1,1	13,9
ULOQ	35	-9,7	-5,8	-0,9	5,0	6,2	3,2	7,6	14,8

		PRECISION (% CV) INTERDAY							
		VAMS				DBS			
QCs	(µg/mL)	AMP	AMOX	MEM	CDX	AMP	AMOX	MEM	CDX
LLOQ	0,5	4,1	6,4	8,1	5,4	3,4	3,2	7,0	5,1
LQC	2	5,4	5,5	7,3	6,9	6,3	4,6	5,1	4,2
MQC	8	5,1	7,4	7,2	4,1	8,0	6,6	9,1	9,2
HQC	20	4,2	7,2	6,5	5,4	4,7	5,5	7,5	2,1
ULOQ	35	3,4	3,9	3,9	4,9	3,5	4,4	3,3	4,7

		PRECISION (% CV) INTRADAY							
		VAMS				DBS			
QCs	(µg/mL)	AMP	AMOX	MEM	CDX	AMP	AMOX	MEM	CDX
LLOQ	0,5	7,1	9,9	12,4	11,1	5,5	9,4	13,5	13,0
LQC	2	9,9	9,3	8,7	10,7	6,9	8,8	8,0	7,4
MQC	8	3,5	7,2	5,1	7,5	6,1	5,4	6,8	9,2
HQC	20	4,7	4,4	3,8	3,7	5,3	6,0	4,3	6,9
ULOQ	35	8,5	8,3	8,8	8,2	7,6	9,0	6,8	4,7

QC, quality controls; AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil; LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low quality control; MQC, medium quality control; HQC, high quality control; ULOQ, upper limit of quantification.

stability was recorded for DBS devices, where degradation percentages measured were similar to those observed for the frozen samples, while samples loaded into the VAMS showed about 20% degradation. The same trend was observed for medium-term stability (7 days): RT storage resulted into high analytes degradation (around 70%), whereas a 30% loss was observed for samples stored at -20 °C and -80 °C, regardless of the microsampling system used. A significant difference between DBS and VAMS was observed after a week storage at 4 °C; under this condition, DBS samples showed a 20-40% degradation, but a loss of about 60% was observed for the compounds loaded into VAMS. In all cases and conditions, CDX was the most stable compound, showing an acceptable short-term stability, with a degradation rate below 15%, in all devices and storage conditions. Only after medium-term storage

in unfrozen conditions, CDX degradation percentage was significant. This evidence highlights that a great difference in terms of stability could be retrieved among different β -lactams.

These data suggest that microsampling devices storage at -20 °C could guarantee short-term stability of the drugs investigated in this study. Notably, DBS devices seemed to be more efficient than VAMS in preventing drug degradation when stored at 4 °C, for both short and medium-term storage. A box-plot statistical representation of data from DBS and VAMS in all storage conditions after 7 days is reported in Figure 5 as mean value for the four β -lactams tested for each device and condition. The statistical analysis of our dataset confirmed that, when stored at 4 °C, VAMS degradation percentages for these analytes were higher compared to DBS.

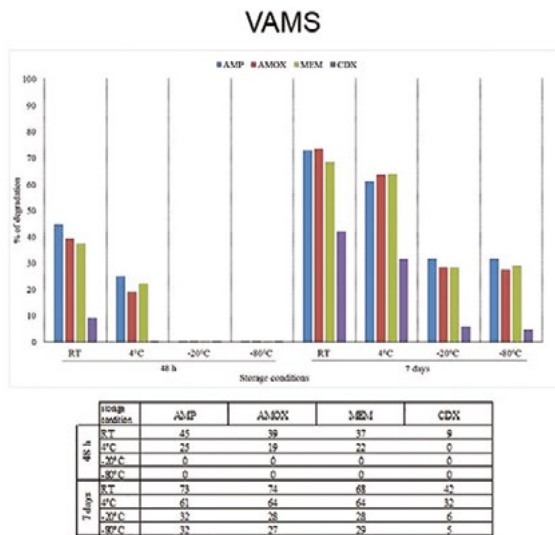


Figure 3 Ampicillin (AMP), amoxicillin (AMOX), meropenem (MEM) and cefadroxil (CDX) stability in volumetric absorptive microsampling (VAMS) samples. Stability over time (2 and 7 days) and at different temperatures (RT, 4°C, -20°C, -80°C) is reported as degradation percentage

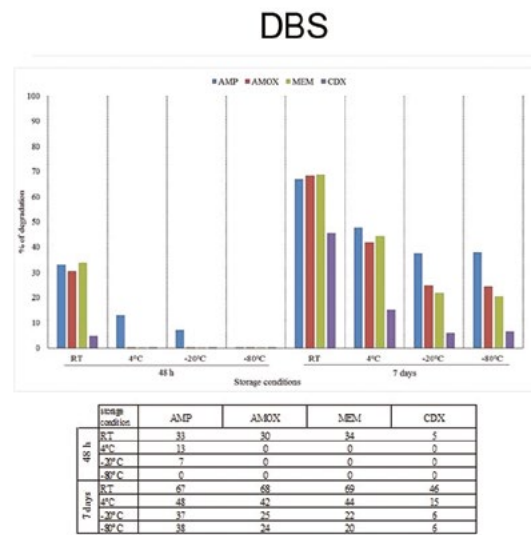


Figure 4 Ampicillin (AMP), amoxicillin (AMOX), meropenem (MEM) and cefadroxil (CDX) stability in dried blood spot (DBS) samples. Stability over time (2 and 7 days) and at different temperatures (RT, 4°C, -20°C, -80°C) is reported as degradation percentage

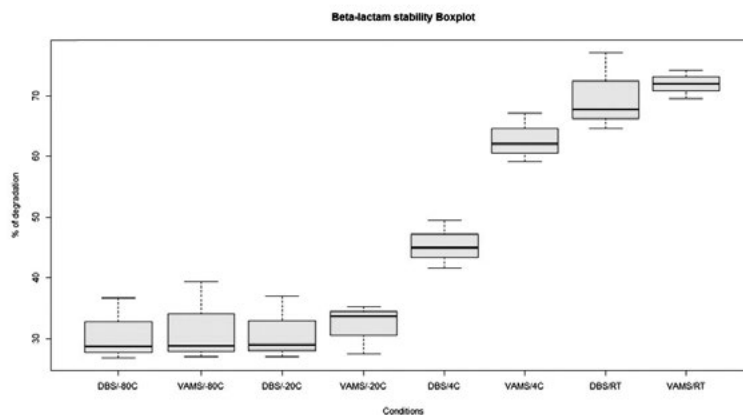


Figure 5 Boxplot diagram of β -lactams 7-days stability in different storage conditions.

Influence of blood spotting and spot recovery procedures on DBS hematocrit-related inaccuracy, a comparison with VAMS.

The hematocrit effect is a well-documented bias commonly encountered during DBS-based bioanalytical methods development (15,25,26). The different physical properties of blood samples characterized by different hematocrit values commonly lead to significant inaccuracies in analytes quantification when samples are spotted on DBS surface.

To this purpose, we provided an evaluation of the hematocrit-based area bias encountered for β -lactams on DBS compared to VAMS. Moreover, we investigated different cases of volumetric and non-volumetric DBS generation, coupled to different DBS recovery approaches, to provide a proof-of-concept of the most frequent errors in DBS practice.

The QCs for VAMS, and DBS produced in different recovery conditions, as described in the methods section, are reported in Table 4. Two different hematocrit values were used (40%, M-HT and 60%, H-HT) and calibration curves for VAMS and DBS were generated. In particular, for calibration curves for DBS, H-HT samples (undiluted blood samples) were prepared using two different procedures for spotting (by pipetting or hanging drop) and analysis (by whole spots or fixed-size punches).

The effect of hematocrit on VAMS by analyzing blood with different hematocrit values (sample numbers 9 and 10) was analyzed (Table 5), and no significant difference in precision and trueness was observed. The same QCs were then analyzed by applying a volumetric drop on DBS. Samples were either extracted by cutting the whole blood spot from DBS (sample 1 and 2 in Table 4), or by a fixed-diameter central punch (sample 3 and 4 in Table 4). As expected, quantification results obtained by whole-spot

Table 4

Experimental set-up of the Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) and Dried Blood Spot (DBS) accuracy dependance upon different spotting/recovery procedures.

	Type of spotting	Punching method	Hematocrit value (%)	Sample number
DBS	micropipette	whole spot	40	1
			60	2
		punch	40	3
			60	4
	hanging drop	whole spot	40	5
			60	6
		punch	40	7
			60	8
VAMS			40	9
			60	10

Table 5

Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) hematocrit bias-dependance. The results of the Quality Controls samples (QC) measurements and trueness expressed as % bias for the four β -lactam antibiotics are shown.

	QCs $\mu\text{g/mL}$	AMP $\mu\text{g/mL}$	Hematocrit influence on VAMS						
			% bias	AMOX $\mu\text{g/mL}$	% bias	MEM $\mu\text{g/mL}$	% bias	CDX $\mu\text{g/mL}$	% bias
H-HT	2	2.7	36	2.6	32	1.9	-6	2.6	31
	8	8.5	7	8.6	8	7.7	-3	8.5	6
	20	20.9	5	21.2	6	19.3	-3	20.3	2
M-HT	2	2.4	21	2.2	11	1.8	-12	2.0	-1
	8	7.7	-4	7.0	-12	7.1	-11	7.3	-9
	20	18.9	-6	17.7	-12	17.3	-14	17.7	-12

AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil; H-HT, high hematocrit level (60%); M-HT, medium hematocrit level (40%).

extraction were accurate in both hematocrit conditions, as shown by the % bias within normal reference ranges observed in all conditions (Table 6). These results confirmed that the whole blood spot procedure could minimize hematocrit-based area bias when a precise volume of blood was volumetrically spotted on DBS. Conversely, the hematocrit effect was critical when DBS samples were analyzed by recovering a fixed-diameter central punch (Table 7). Using this procedure, % bias quantification errors ranged from -25% to -50% and higher variations were observed when a blood sample with a hematocrit value different from the one used in the calibration curve was analyzed.

Finally, a third set of non-volumetric DBS samples was

produced by spotting the same blood with the two different hematocrits through the deposition of a hanging-drop using a Pasteur pipette, thus simulating the generation of a non-volumetric blood application on DBS in real-life conditions. These samples were analyzed using two recovery procedures: whole-spot (sample 5 and 6 in Table 4), or fixed-diameter central punch (sample 7 and 8 in Table 4). To guarantee that the minimal required volume (20 μ L) was effectively applied on the DBS device in all tested conditions, medium blood spot diameters obtained were measured and compared to those obtained by micropipette volumetric application. Diameters from micropipette spotting were of 0.51 +/- 0.05 cm similar to those from Pasteur application (0.65 +/- 0.12). Results

Table 6

Dried Blood Spot (DBS) hematocrit bias-dependance in whole spot recovery of volumetrically spotted blood samples. The results of the Quality Controls samples (QC) measurements and trueness expressed as % bias for the four β -lactam antibiotics are shown.

		Hematocrit influence on whole spot DBS – volumetric spot							
	QCs	AMP μ g/mL	% bias	AMOX μ g/mL	% bias	MEM μ g/mL	% bias	CDX μ g/mL	% bias
H-HT	2	2.1	3	2.0	-2	1.8	-10	2.2	9
	8	7.5	-7	7.8	-3	7.0	-13	8.1	1
	20	21.6	8	19.4	-3	21.7	8	22.2	11
M-HT	2	2.1	6	2.0	1	2.1	4	2.1	3
	8	6.6	-18	6.6	-18	6.4	-19	6.9	-14
	20	20.0	0	19.3	-4	20.1	0	19.3	-4

AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil; H-HT, high hematocrit level (60%); M-HT, medium hematocrit level (40%).

Table 7

Dried Blood Spots (DBS) hematocrit bias-dependance in fixed-volume punch recovery of volumetrically spotted blood samples. The results of the Quality Controls samples (QC) measurements and trueness expressed as % bias for the four β -lactam antibiotics are shown

		Hematocrit influence on punched DBS – volumetric spot							
	QCs μ g/mL	AMP μ g/mL	% bias	AMOX μ g/mL	% bias	MEM μ g/mL	% bias	CDX μ g/mL	% bias
H-HT	2	1.7	-17	1.8	-9	1.5	-24	2.0	2
	8	8.3	4	8.9	11	8.8	10	8.6	8
	20	18.2	-9	17.8	-11	19.6	-2	18.6	-7
M-HT	2	1.3	-36	1.2	-39	1.2	-42	1.0	-51
	8	5.2	-35	5.3	-34	5.1	-36	5.5	-31
	20	14.2	-29	14.3	-28	14.7	-26	15.1	-25

AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil; H-HT, high hematocrit level (60%); M-HT, medium hematocrit level (40%).

from fixed-diameter punch recovery procedure showed that the quantification of samples with lower hematocrit values retrieved % bias errors ranging from -29% to -57%, thus resulting into a significant hematocrit area bias (M-HT row in Table 8). However, when samples with the same hematocrit values of the calibration curve were analyzed, method trueness resulted to be acceptable for all analytes tested (H-HT row in Table 8).

When the same Pasteur-spotted DBS replicates were analyzed by whole-spot recovery, a high variability of the results was observed also when samples having the same hematocrit value of the calibration curve were analyzed (Table 9). These data confirmed the need of applying a "hematocrit correction factor" when using a non-volumetric DBS approach. Alternatively, the hematocrit effect and the optimized volume range need to be finely

tuned and validated for each method, even when the minimal volume required from the device and established by the manufacturer, is correctly used (Whatman products - Cytiva. <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/whatman-laboratory-filtration>).

DISCUSSION

An optimized antibiotic treatment offering a correct balance between efficacy and toxicity, requires plasma concentrations higher than MIC values during treatment duration that also minimize the rising of resistant and nosocomial strains with higher MICs (3,27). The "optimal exposure" for antibiotic therapies is often determined upon dosing interval time percentage during which serum antibiotic concentration remains at least above

Table 8

Dried Blood Spots (DBS) hematocrit bias-dependance in fixed-volume punch recovery of hanging drop spotted blood samples. The results of the Quality Controls samples (QC) measurements and trueness expressed as % bias for the four β -lactam antibiotics are shown

Hematocrit influence on punched DBS – non-volumetric spot									
	QCs $\mu\text{g}/\text{mL}$	AMP $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias	AMOX $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias	MEM $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias	CDX $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias
H-HT	2	1.60	-20	1.7	-13	1.6	-22	1.6	-21
	8	7.0	-12	7.1	-11	7.0	-12	6.8	-15
	20	18.9	-5	18.8	-6	20.0	0	18.7	-7
M-HT	2	0.9	-53	1.0	-50	1.0	-50	0.9	-57
	8	4.4	-45	4.7	-42	5.2	-36	5.0	-38
	20	12.2	-39	12.7	-36	14.1	-29	13.2	-34

AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil; H-HT, high hematocrit level (60%); M-HT, medium hematocrit level (40%).

Table 9

Dried Blood Spots (DBS) hematocrit bias-dependance in whole spot recovery of hanging drop spotted blood samples. The results of the Quality Controls samples (QC) measurements and trueness expressed as % bias for the four β -lactam antibiotics are shown.

Hematocrit influence on whole spot DBS – non-volumetric spot									
	QCs $\mu\text{g}/\text{mL}$	AMP $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias	AMOX $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias	MEM $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias	CDX $\mu\text{g}/\text{mL}$	% bias
H-HT	2	2.8	40	3.7	85	3.4	72	3.4	69
	8	13.0	62	11.1	39	12.7	58	12.0	50
	20	27.8	39	20.8	4	26.4	32	24.7	24
M-HT	2	1.7	-13	1.6	-22	1.5	-24	1.8	-9
	8	4.6	-42	4.7	-41	4.5	-43	5.0	-37
	20	12.3	-39	12.4	-38	11.5	-42	12.7	-36

AMP, ampicillin; AMOX, amoxicillin; MEM, meropenem; CDX, cefadroxil; H-HT, high hematocrit level (60%); M-HT, medium hematocrit level (40%).

the MIC value for the target pathogen strain (28). For β -lactam antibiotics, a minimal time range of 40-60% of the therapeutic interval is proposed to exert optimal efficacy and eradication (28). Notably, for patients in the intensive care unit or with severe infections a 100%-time range using concentrations above MIC is required for a good outcome (28-30). For these reasons, a valuable TDM method for β -lactams should be able to detect drugs over a broad concentration range (from <1 to 50 μ g) to assess a significant above-MIC concentration over time for a broad spectrum of target pathogens.

TDM of antibiotics is important in newborns, elderly or critically ill patients; in these subjects pharmacokinetic is variable due to modifications in renal clearance and body water distribution, or other parameters. Moreover, TDM of β -lactams is highly recommended in those sub-sets of patients because of accelerated drug elimination rate related to increased renal clearance.

In this paper we developed and validated a DBS- and VAMS-based bioanalytical method for the simultaneous detection and quantification of four β -lactams: AMP, AMOX, MEM and CDX. Similar methods have been described in literature for the measurement of different β -lactams, such as vancomycin, piperacillin and cefepime (9,18-21).

It is important to note that in the DBS-based protocols, the IS was directly added to the extract sample, before LC-MS/MS analysis, since we considered that its addition to the blood sample before spotting was not applicable to routine clinical practice. This should be considered undoubtedly as a limitation of the methodology presented since a normalization method cannot be carried out on the extraction procedure. Therefore, when analyzing patients' samples, it would be preferable to collect multiple blood spots from the same patient to minimize the risk of errors during the extraction procedure.

Overall imprecision was evaluated considering both precision and trueness. Run replicates for intra- and inter-day reliability were analyzed by one-way ANOVA test. Confidence limit of 0.05 was considered. The p values obtained for both VAMS and DBS were below the threshold value for nearly all QCs, proving that the difference in analytes concentration did not critically influence the results obtained. The data presented suggest that the analytical method here described may be considered suitable to be applied in the clinical practice.

Altogether, our results highlighted comparable trueness and precision values retrieved in both microsampling-based methods. More in detail, we showed that DBS devices guarantee a higher β -lactam stability compared to VAMS, especially when stored at 4°C, differently from what described for vancomycin, piperacillin and cefepime that are equally stable on VAMS and DBS (9,18,19,31). In our study, AMP, AMOX, MEM and CDX were more stable when devices were stored at -20°C and -80°C, as expected for compounds more susceptible to degradation also in human biological matrices (32,33). DBS and VAMS should limit compound degradation, as they are frequently used for long distance shipments; however, we reported that medium and long-

term storage should be avoided when dosing β -lactams analytes.

Finally, we described an analysis and proof-of-concept of the hematocrit-based area bias observed for β -lactams loaded on DBS compared to VAMS. According to DBS usage guidelines (34), hematocrit effect should always be evaluated, especially in newborns where hematocrit values have a high Inter-individual variability. The overall hematocrit effect depends on different factors including differences in blood spreading over cellulose-based DBS (hematocrit-based area bias) and variations in matrix-effect and recovery yields (hematocrit-based recovery bias and matrix effect bias) (34,35). The hematocrit-based area bias is one of major responsible factor for higher inaccuracy and is essentially due to different volumes obtained from blood spots with different hematocrits on DBS. When a fixed-diameter partial punch is used to recover the DBS spot, variations in the total amount of analytes is obtained after extraction. Therefore, the application of a fixed volume blood spot on DBS and recovery of the whole DBS sample are suggested to collect a specific volumetric specimen thus allowing the recovery of a similar blood volume in all hematocrit conditions tested (26). In clinical practice, a precise volumetric blood spot is difficult to obtain because microsampling devices are frequently used by untrained personnel or patients themselves at home. Different strategies have been recently proposed to overcome this limitation by developing various devices to generate a volumetric spot from a non-volumetric blood drop, such as HemaXis, hemaPEN and *in situ* generated DPS (36-39). Alternatively, hematocrit correction strategies need to be used for non-volumetrically generated DBS after hematocrit evaluation on DBS samples by spectroscopic techniques (40). However, all these approaches and corrections are time-consuming and often expensive. An alternative approach could be the identification of a volume range in which DBS-based results are still acceptable. Afterwards, DBS pre-printed with two concentric circles, representing the minimally required and maximally allowed volume, should be produced and given to patients to help them collecting an appropriate DBS spot. This approach however is still prone to errors caused by patients and operators inexperience.

Our results support the use of the whole blood spot recovery to minimize quantification inaccuracies in volumetric DBS applications, and confirm the importance of using a hematocrit correction factor when a non-volumetric DBS procedure is carried out. It is worth to underline that the use of a constant diameter normalization by DBS central punch allows accurate measurements only when samples tested have hematocrit values similar to those used for the generation of the calibration curve.

VAMS microdevices could successfully overcome the hematocrit limitation for β -lactams, but at the same time should be evaluated with caution when considering compounds stability in different storage conditions. We showed that RT storage should be always avoided for β -lactams when using either DBS or VAMS. In addition, our results highlighted that for AMP, AMOX, MEM and

CDX the use of DBS devices guarantees higher analytes stability in refrigerated conditions (4°C). Storage at -20°C remained however the best condition for all analytes and both VAMS and DBS.

At this stage the use of real patients' samples was not considered and was out of the scope of this specific study; however, it is of utmost importance to verify our methodology in a real-life setting to verify the influence of additional variability aspects that might influence either DBS or VAMS-based TDM of β -lactams.

REFERENCES

- Martinez MN, Papich MG, Drusano GL. Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2795-805.
- Wong G, Sime FB, Lipman J, et al. How do we use therapeutic drug monitoring to improve outcomes from severe infections in critically ill patients? *BMC Infect Dis* 2014;14:288.
- Roberts JA, Norris R, Paterson DL, et al. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73:27-36.
- Jager NGL, van Hest RM, Lipman J, et al. Therapeutic drug monitoring of anti-infective agents in critically ill patients. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016;9:961-79.
- Rivera-Chaparro ND, Cohen-Wolkowicz M, Greenberg RG. Dosing antibiotics in neonates: review of the pharmacokinetic data. *Future Microbiol* 2017;12:1001-16.
- Liem TBY, Slob EMA, Termote JUM, et al. Comparison of antibiotic dosing recommendations for neonatal sepsis from established reference sources. *Int J Clin Pharm*. 2018;40:436-43.
- Pacifici GM, Labatia J, Mulla H, et al. Clinical pharmacokinetics of penicillins in the neonate: a review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65:191-8.
- Howie SRC. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ* 2011;89:46-53.
- Barco S, Castagnola E, Moscatelli A, et al. Volumetric adsorptive microsampling-liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of four antibiotics in human blood: Method development, validation and comparison with dried blood spot. *J Pharm Biomed Anal* 2017;145:704-10.
- Spooner N, Denniff P, Michielsen L, et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* 2015;7:653-9.
- Tey HY, See HH. A review of recent advances in microsampling techniques of biological fluids for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr A* 2021;1635:461731.
- De Kesel PM, Sadones N, Capiou S, et al. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. *Bioanalysis* 2013;5:2023-41.
- Londhe V, Rajadhyaksha M. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. *J Pharm Biomed Anal* 2020;182:113102.
- Sulochana SP, Daram P, Srinivas NR, et al. Review of DBS methods as a quantitative tool for anticancer drugs. *Biomed Chromatogr* 2019;33:e4445.
- Velghe S, Stove CP. Volumetric absorptive microsampling as an alternative tool for therapeutic drug monitoring of first-generation anti-epileptic drugs. *Anal Bioanal Chem* 2018;410:2331-41.
- Mingas PD, Zdovc J, Grabnar I, et al. The Evolving Role of Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Monoclonal Antibodies in Inflammatory Diseases. *Molecules* 2021;26:1787.
- Charlier B, Coglianese A, De Rosa F, et al. The Effect of Plasma Protein Binding on the Therapeutic Monitoring of Antiepileptic Medications. *Pharmaceutics* 2021; 5;13:1208.
- Scribel L, Zavascki AP, Matos D, et al. Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: Analytical validation and clinical assessment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2020;1137:121897.
- Moorthy GS, Downes KJ, Vedar C, et al. A whole blood microsampling assay for vancomycin: development, validation and application for pediatric clinical study. *Bioanalysis* 2020;12:1295-310.
- Martens-Lobenhoffer J, Monastyrski D, Tröger U, et al. Stability of meropenem in plasma versus dried blood spots (DBS). *J Pharm Biomed Anal* 2019;170:279-84.
- Moorthy GS, Vedar C, Downes KJ, et al. Microsampling Assays for Pharmacokinetic Analysis and Therapeutic Drug Monitoring of Antimicrobial Drugs in Children: A Critical Review. *Ther Drug Monit* 2021;43:335-45.
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310:2191-4.
- D'Avolio A, Cantù M, Gervasoni J, et al. Bioanalytical method validation of quantitative mass spectrometry based assay: experimental protocols and regulations. *Biochim Clin* 2018;42:51-61.
- EUCAST. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (last accessed: january 2022)).
- De Kesel PMM, Capiou S, Lambert WE, et al. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis* 2014;6:1871-4.
- Zheng N, Yuan L, Ji QC, et al. "Center punch" and "whole spot" bioanalysis of apixaban in human dried blood spot samples by UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015;988:66-74.
- Mouton JW, Vinks AA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:201-10.
- Muller AE, Huttner B, Huttner A. Therapeutic Drug Monitoring of Beta-Lactams and Other Antibiotics in the Intensive Care Unit: Which Agents, Which Patients and Which Infections? *Drugs* 2018;78:439-51.
- Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-10.
- Craig WA. Antimicrobial resistance issues of the future. *Diagn Microbiol. Infect Dis* 1996;25:213-7.
- Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, et al. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis* 1988;158:831-47.
- Andrighetti NB, Lisboa LL, Hahn SR, et al. Simultaneous determination of vancomycin and creatinine in plasma applied to volumetric absorptive microsampling devices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2019;165:315-24.
- D'Cunha R, Bach T, Young BA, et al. Quantification of Cefepime, Meropenem, Piperacillin, and Tazobactam in Human Plasma Using a Sensitive and Robust Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method, Part 2: Stability Evaluation. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e00861-18.
- Capiou S, Veenhof H, Koster RA, et al. Official Internatio-

- nal Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit* 2019;41:409-30.
35. Carlier M, De Waele JJ, Verstraete AG, et al. Exploration of the pre-analytical stability of β -lactam antibiotics in plasma and blood--implications for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:e227-30.
 36. Fan L, Lee JA. Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment. *Bioanalysis* 2012;4:345-7.
 37. Leuthold LA, Heudi O, Déglon J, et al. New microfluidic-based sampling procedure for overcoming the hematocrit problem associated with dried blood spot analysis. *Anal Chem* 2015;87:2068-71.
 38. Neto R, Gooley A, Breadmore MC, et al. Precise, accurate and user-independent blood collection system for dried blood spot sample preparation. *Anal Bioanal Chem* 2018;410:3315-23.
 39. Hauser J, Lenk G, Ullah S, et al. An Autonomous Microfluidic Device for Generating Volume-Defined Dried Plasma Spots. *Anal Chem* 2019;91:7125-30.
 40. Capiou S, Wilk LS, De Kesel PMM, et al. Correction for the Hematocrit Bias in Dried Blood Spot Analysis Using a Non-destructive, Single-Wavelength Reflectance-Based Hematocrit Prediction Method. *Anal Chem* 2018;90:1795-804.

Applicazione dell'analisi dei Big Data nella valutazione dell'utilità clinica della determinazione degli anticorpi anti SARS-CoV-2 di tipo IgM: l'esperienza di Modena

Valentina Pecoraro¹, Tommaso Pirotti¹, Tommaso Trenti¹, Mario Plebani²

¹Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, AUSL Modena

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso Nazionale SIBioC, 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, sotto forma di Comunicazione Orale

ABSTRACT

Big Data analysis to evaluate the clinical utility of IgM anti SARS-CoV-2 determination: the Modena experience

Introduction: since the scarce diagnostic accuracy of specific circulating antibodies for SARS-CoV-2, we aimed to assess the clinical utility of IgM detection in SARS-CoV-2 using the Big Data analysis.

Methods: this is a retrospective study; all the blood samples collected between March and September 2020 were processed using a lateral flow immunoassay (LFIA) kit for IgG and IgM antibody testing. Positives results were tested again using a chemiluminescent method. Subjects confirmed with a positive result were contacted for a molecular test. **Results:** more than 69 000 serological tests (from 42 911 subjects) were performed. 94.5% (40 559/42 911) of subjects had negative results for both IgG and IgM. 1.5% (n = 640) subjects had both IgG and IgM positive results, and viral RNA research confirmed positivity in 16% (85/533). Among subjects with IgG negative and IgM positive results (n=271), a positivity was confirmed in 1% (4/270). Conversely, in subjects with IgG positive and IgM negative results, a positivity was confirmed in 8% (97/1 215). Therefore, the analysis suggests that up to 98% of serological test results of IgM positivity and IgG negativity are false positive.

Discussion: the study, based on Big Data analysis application, proved the scarce clinical utility of IgM detection in COVID-19 management, and underlines the responsibility of laboratory professionals in highlighting the limitations of the serological tests also due to uncertainty in their interpretation.

Keywords: anticorpi IgM, SARS-CoV-2, Big Data

INTRODUZIONE

Il percorso per la diagnosi di COVID-19 è ormai ben definito in tutto il mondo e basato sull'esecuzione di accurati test di biologia molecolare che prevedono la ricerca dell'RNA virale preferenzialmente su tampone naso e/o oro-faringeo (1). Allo stesso tempo sono stati resi disponibili gli esami sierologici per la determinazione degli anticorpi (Abs) anti SARS-CoV-2 sia IgG sia IgM, essenziali ed informativi per la sorveglianza e il controllo dell'infezione, utili per confermare un pregresso contatto con il virus. Questa caratteristica differenzia l'esame sierologico dal test molecolare che invece stabilisce se un

soggetto è infetto nel momento dell'esecuzione del test, e quindi potenzialmente in grado di trasmettere il virus.

Durante i primi mesi della pandemia, dato il limitato accesso agli esami diagnostici molecolari e l'alta incidenza degli individui asintomatici, la maggior parte dei soggetti è stata sottoposta ad esami sierologici; questi risultati hanno fornito importanti informazioni riguardo la diffusione del virus nella popolazione e sono stati utilizzati per favorire la ripresa economica e sociale (2). Tuttavia, il significato clinico della determinazione degli Abs specifici per SARS-CoV-2 e la durata della protezione contro l'infezione rimangono ancora oggetto di molti studi nazionali e internazionali.

Corrispondenza a: Valentina Pecoraro, Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, AUSL Modena. Ospedale Civile S. Agostino Estense, Via Giardini 1355, 41126 Modena. e-mail: v.pecoraro@ausl.mo.it

Ricevuto: 31.01.2022

Revisionato: 17.02.2022

Accettato: 16.03.2022

Publicato on-line: 20.04.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.014

SARS-CoV-2 è un β -coronavirus formato da quattro proteine strutturali: nucleocapside (N), membrana (M), envelope (E) e spike (S). L'ingresso del virus nella cellula è dovuto al legame tra il dominio RBD (receptor binding domain) della proteina Spike, espressa sulla superficie delle particelle virali, e il recettore ACE2, espresso dalla cellula ospite. La risposta anticorpale può essere diretta contro tutte le proteine virali, anche se le proteine S e la N sono considerate i bersagli principali della risposta umorale (3). L'utilità degli esami sierologici è influenzata dalla cinetica della risposta anticorpale. In caso di infezione da SARS-CoV-2, gli anticorpi di tipo IgM e IgG possono insorgere quasi contemporaneamente entro 2-3 settimane dall'esordio della malattia. Le IgM compaiono velocemente ma hanno una emivita molto breve. Le IgG sono determinabili nel siero dopo circa 7-14 giorni dall'inizio dei sintomi. Tuttavia, quanto a lungo gli anticorpi specifici rimangono rilevabili nel siero è ancora oggetto di studio (4).

In commercio, sono a disposizione molti esami di laboratorio per la determinazione degli anticorpi specifici anti-SARS-CoV-2. Si tratta di test ELISA, in chemiluminescenza (CLIA) o test immunocromatografici (LFIA), che hanno il vantaggio di poter essere eseguiti con modalità meno rigorose rispetto alle metodiche di biologia molecolare usate per la ricerca dell'RNA virale. Tuttavia, l'accuratezza diagnostica non è ottimale (5). Una recente meta-analisi ha evidenziato come i diversi metodi analitici mostrino un ampio intervallo di valori di sensibilità (97,8% per CLIA e 66% per LFIA) e adeguati valori di specificità (96,6% e 99,7% rispettivamente) (6). Inoltre, l'accuratezza varia se si considerano separatamente gli Abs IgG e IgM. I metodi per la determinazione delle sole IgG mostrano alta sensibilità e specificità; i valori sono ottimali se la determinazione è effettuata almeno dopo 2 settimane dal rilevamento dell'RNA virale. Le IgM sono solitamente considerate indicative di una recente infezione, ma la scarsa sensibilità dei metodi mette in dubbio l'utilità clinica della determinazione di questi Abs (7,8), pur rimanendo importante il loro ruolo nell'attività di neutralizzazione (9,10).

Fin dai primi momenti dall'esplosione della pandemia di COVID-19, è stata raccolta una gran quantità di dati, sia qualitativi sia quantitativi, con l'intento di accumulare e accrescere conoscenze in questo campo per arginare e combattere la diffusione del virus. In questo contesto, i progressi degli ultimi anni nel campo dell'intelligenza artificiale, delle tecnologie informatiche e computazionali dei Big Data, hanno consentito di gestire in modo produttivo queste informazioni per migliorare l'utilizzo delle risorse sanitarie.

Il termine Big Data non indica solamente una gran quantità di dati, ma definisce un concetto più ampio, descritto dalle 5 V: velocità (velocità di acquisizione, elaborazione e manipolazione dei dati); volume (ovvero ampia quantità di informazioni disponibili); varietà (dati provenienti da diverse fonti e in diversi formati); veridicità (qualità dei dati, privi di errori); valore (possibilità di apportare benefici e produrre conoscenza) (11,12,13).

La disponibilità di grandi quantità di dati in associazione a strumenti informatici adeguati consente di applicare il concetto di Big Data ai dati di laboratorio, producendo informazioni utili per lo studio, il controllo e il monitoraggio della pandemia, per prevedere l'evoluzione della diffusione dell'infezione, per l'aggiornamento periodico sulla situazione da parte dei governi e delle istituzioni e per prendere decisioni riguardo l'allocazione delle risorse sanitarie (14).

Questa modalità di gestione e analisi di un database di grande dimensioni è stata applicata al nostro studio. Presso il Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell'Azienda USL di Modena sono stati eseguiti migliaia di esami sierologici fin dalle prime fasi della pandemia, e raccolta una grande quantità di dati. Il Dipartimento ha a disposizione un database che raccoglie circa 15 milioni di risultati l'anno. Si tratta di esami eseguiti in tutti i laboratori provinciali che servono un bacino di 700 000 abitanti. Il database è aggiornato in modo continuo quotidianamente, consentendo di ottenere un quadro preciso sull'andamento dei vari esami, per cui è possibile sapere in ogni istante quanti esami sono prenotati, quanti sono in lavorazione e quanti sono refertati. Inoltre è possibile verificare le stesse informazioni anche per i giorni e mesi precedenti.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la reale utilità clinica della determinazione degli Abs anti SARS-CoV-2 di tipo IgM.

METODI

Per questo studio sono stati analizzati, in modo retrospettivo, i risultati degli esami sierologici eseguiti per la determinazione degli Abs anti SARS-CoV-2 in campioni raccolti dall' 11 marzo al 30 settembre 2020 (15,16). I campioni analizzati appartenevano agli operatori sanitari e ai pazienti degenti nell'ospedale Sant'Agostino Estense di Modena, per i quali era stata richiesta ed eseguita la ricerca anticorpale per il controllo dell'infezione da SARS-CoV-2. La determinazione degli Abs anti-SARS-CoV-2 di tipo IgG e IgM è stata eseguita utilizzando due differenti piattaforme analitiche. All'arrivo in laboratorio i sieri sono stati analizzati mediante un metodo immunocromatografico (Techno Genetics KHB Group-Shanghai) per cui Abs specifici IgG e/o IgM sono visualizzati direttamente sul dispositivo dalla comparsa (o dalla assenza) di una banda specifica dopo un periodo di incubazione di 15 minuti. I campioni positivi (comparsa di una banda debole o ben definita) sono stati analizzati con un metodo in chemiluminescenza (iFlash 1800-YHLO Biotech Co., Ltd., Shenzhen, China) per la conferma della positività. Per valori compresi tra 9 e 11 AU/mL, il campione è stato refertato dubbio, per valori >11 AU/mL il campione è stato considerato positivo, indicando una potenziale infezione da SARS-CoV-2. La procedura è stata eseguita secondo le istruzioni dei produttori.

I soggetti con esito positivo sono stati successivamente contattati dal Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica per l'esecuzione di un tampone oro- o naso-faringeo per la ricerca dell'RNA virale (Alinity m SARS-CoV-2 Assay-

Abbott Molecular) per la diagnosi definitiva.

Per questo studio retrospettivo sono stati analizzati i dati già presenti all'interno del database dell'Azienda USL di Modena. Essendo lo studio retrospettivo e osservazionale, la numerosità campionaria non è stata calcolata a priori, ma sono stati considerati tutti i dati raccolti nel database nel periodo dello studio. Data la mancanza di consenso informato e l'impossibilità della sua acquisizione a posteriori, i dati sono stati resi anonimi e negata la possibilità a ciascun ricercatore o utilizzatore dei dati di risalire all'identità del paziente. Un ricercatore ha estratto i dati dal database utilizzando specifiche query di ricerca senza includere alcun codice identificativo personale, producendo tabelle di analisi. I dati sono stati estratti tramite query SQL dal database "Vertica SQL" in cui vengono archiviate le informazioni provenienti dal sistema informativo aziendale. In fase di estrazione, i dati sono stati pseudonimizzati eliminando tutte le informazioni non utili all'indagine e sostituendo al codice unico personale e al codice analisi, rispettivamente un codice realizzato tramite procedura "Secure Hash Algorithm" che impedisse di risalire ai codici di partenza, ma consentisse viceversa di collegare le analisi effettuate per ogni individuo, all'individuo stesso. Gli individui scelti sono tutti quelli presenti nel database alla data del 30.09.2020 che abbiano effettuato le analisi sierologiche e i tamponi per COVID-19 necessari per lo studio. Il matching e l'analisi statistica sono stati effettuati utilizzando il pacchetto "Pandas" in "Python 3.8", adeguatamente interfacciato con "Vertica SQL" attraverso il pacchetto ufficiale nativo "Vertica-Python". Per gli individui che avevano numerosi

tamponi, tutti negativi, si è considerato solamente l'ultimo risultato in modo da verificare la traccia del paziente nel database e confermare la sua non positività. Viceversa, per gli individui che avessero sia tamponi positivi che negativi, si è considerato il primo tampone positivo come inizio dell'infezione. Nella definizione del dataset sono state scartate esclusivamente le analisi con risultati non determinabili e quelle che presentavano come risultato un errore tecnico legato a provette non analizzabili. Un secondo ricercatore ha utilizzato le tabelle prodotte per l'analisi dei dati. La Figura 1 mostra il flusso per l'estrazione dei dati.

I dati analizzati per lo studio della frequenza degli anticorpi nella popolazione considerata, sono stati stratificati in sottogruppi in base alla tipologia di immunoglobulina.

RISULTATI

Nel periodo di studio, sono stati eseguiti 69 343 test sierologici in 42 911 soggetti, e 140 965 tamponi oro- o naso-faringei in 88 771 soggetti. L'arco di tempo trascorso tra il primo esame sierologico e il successivo test molecolare è stato di 7 giorni (intervallo: 4-10). In seguito al riscontro di un risultato positivo dell'esame sierologico, il successivo test molecolare è stato eseguito da 2 346 soggetti.

I risultati della nostra analisi sono riportati in Tabella 1. In sintesi:

- il 94,5% (40 559/42 911) dei soggetti è risultato negativo sia per IgG sia per IgM;

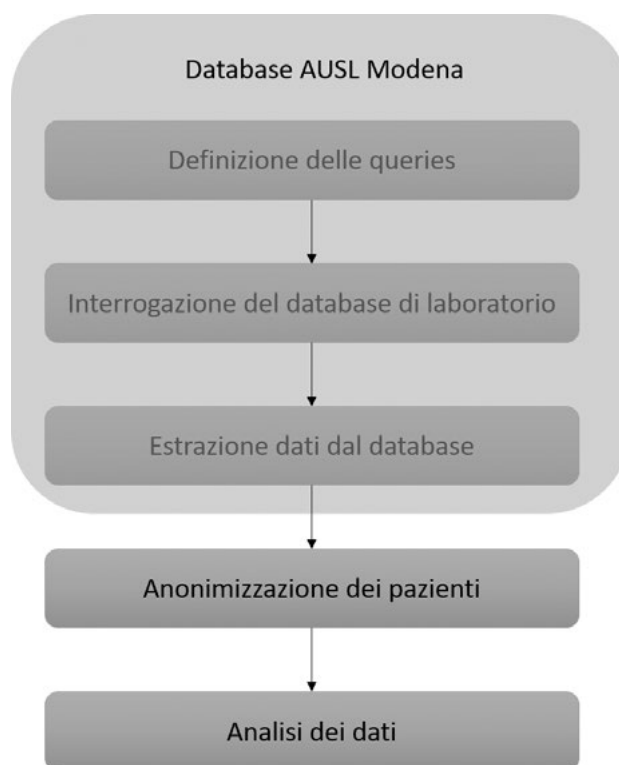


Figura 1

Descrizione del percorso dalla definizione delle query di ricerca all'analisi dei dati.

Tabella 1

Risultati dell'analisi eseguita: esame sierologico e rilevazione dell'RNA virale con relativa positività secondo l'iniziale determinazione di IgG e IgM

Risultato esame sierologico	Numero soggetti	Risultato positivo del successivo test molecolare
Negativo per IgG e IgM	40 559	Non eseguito
Positivo per IgG e IgM	640	85/533 (15,9%)
Positivo per IgG pos e negativo per IgM	1644	97/1215 (7,9%)
Positivo per IgG e dubbio per IgM	152	7/120 (5,8%)
Negativo per IgG e positivo per IgM	271	4/270 (1,5%)
Negativo per IgG e dubbio per IgM	231	3/208 (1,4)

- 1,5% (640/42 911) è risultato positivo per IgG e IgM. La successiva ricerca dell'RNA virale è stata eseguita da 533 soggetti, confermando la positività nel 16% (85/533) degli individui;
- Il 4,2% dei soggetti (1 796/42 911) ha riportato un risultato positivo per le IgG e negativo o dubbio per IgM. La positività del test molecolare è stata confermata in circa l'8% dei soggetti (104/1 335 tamponi eseguiti).
- 502 soggetti avevano un risultato positivo o dubbio per IgM e negativo per IgG. La positività è stata confermata solo in 1,4% dei soggetti (7/478). Successivi esami sierologici hanno mostrato un risultato positivo per IgG in 1,6% soggetti (8/498), di cui 1 paziente aveva una precedente risultato positivo per le sole IgM.

Pertanto, l'analisi dei dati suggerisce che fino al 98% dei risultati positivi per le sole IgM erano in realtà dei risultati falsi positivi, mentre i risultati degli esami sierologici positivi per IgG sono veri positivi confermati dai test molecolari successivi. Pertanto, la determinazione delle IgM non accompagnate da IgG (1,2% dei casi) non sembra essere utile per l'identificazione dei pazienti infettati da SARS-CoV-2.

DISCUSSIONE

L'applicazione dell'analisi dei Big Data ha consentito di elaborare un'ampia quantità d'informazioni contenute nel database dell'Azienda USL di Modena. Questo tipo di approccio non solo ha confermato la nostra ipotesi iniziale che metteva in discussione l'utilità clinica della determinazione delle IgM anti SARS-CoV-2, ma si è rivelata molto utile per ottimizzare il processo analitico dei dati di laboratorio, identificare eventuali errori, guidare un più accurato percorso di screening e gestione dei soggetti durante la pandemia di COVID-19. Il nostro studio ha messo in evidenza che la determinazione delle IgM non è indicativa di una infezione corrente, e la loro

rilevazione, in assenza di IgG è nel 98% dei casi un risultato falso positivo.

Infatti, la rilevazione sierica degli anticorpi di tipo IgG e IgM è influenzata da diversi fattori come il tempo trascorso dall'insorgenza dei sintomi, la possibilità di avere reattività crociata con altre proteine non virali e soprattutto la cinetica anticorpale. La risposta anticorpale innescata dall'infezione da SARS-CoV-2 induce in un primo momento la produzione di IgM seguita in breve tempo da quella di IgG anti N che possono essere determinate nel siero anche 4 giorni dopo l'inizio dei sintomi, per cui potrebbero essere utilizzate per una diagnosi precoce dell'infezione. Tuttavia, gli esami sierologici non sono solitamente reattivi nei primi giorni dopo l'infezione, limitandone l'utilità per la diagnosi di infezione acuta, mentre risultano essere accurati circa 2 settimane dopo l'inizio dei sintomi (1). Questo ne limita l'utilità per la diagnosi di infezione acuta.

In commercio sono disponibili molteplici test ELISA, in chemiluminescenza e immunocromatografici in grado di determinare Abs diretti contro la proteina N e S, i quali presentano diverse caratteristiche di accuratezza diagnostica (6,8,17,18). Recenti studi hanno dimostrato che i test per la determinazione delle IgG hanno prestazioni migliori rispetto a quelli per la determinazione delle IgM (19) e che i test sierologici per la determinazione degli Abs IgG anti-S hanno una maggior sensibilità rispetto agli anti N (20).

Nell'infezione da SARS-CoV-2 gli Abs anti RBD e anti N sono associati all'attività neutralizzante, inibendo l'infettività virale attraverso diversi meccanismi di azione, incluso il blocco del legame della proteina Spike con il recettore ACE2 (21). Gli esami sierologici sono stati ampiamente utilizzati fin dalle prime fasi della pandemia, quando era diffusa la concezione che la presenza di Abs nel siero fosse sufficiente per ridurre la necessità del distanziamento fisico e sociale ed era opinione comune che i soggetti che erano stati a contatto con il virus fossero con buona probabilità immuni da una

reinfezione. Oggi sappiamo che una reinfezione è comunque possibile, per cui, i soggetti che in precedenza hanno contratto il virus, possono infettarsi nuovamente e contribuire alla sua trasmissione. La presenza degli Abs neutralizzanti è associata alla immunità protettiva verso una reinfezione, e al successo vaccinale che riduce la severità dell'infezione. SARS-CoV-2 continua a diffondersi nel mondo con la conseguente necessità di avere a disposizione Abs neutralizzanti da usare come strategia profilattica e terapeutica per prevenire, trattare e monitorare la sua diffusione (22).

La possibilità di riconoscere e legare antigeni riconducibili alla proteina Spike e il suo dominio RBD e la proteina N costituisce una sfida e un'opportunità per la ricerca. La sfida consiste nell'individuare marcatori appropriati con lo sviluppo di esami di laboratorio con ottime caratteristiche che producano risultati accurati. L'opportunità è data dalla disponibilità di marcatori multipli che, se misurati in combinazione, forniscano informazioni riguardo la condizione immunitaria di un soggetto e consentano di definire un profilo sierologico (23). Infatti, è da tener presente che il titolo anticorpale cambia nel tempo e una sola determinazione può non essere sufficiente per classificare un soggetto come immune o meno.

Nonostante la limitata utilità diagnostica degli esami sierologici, questi hanno numerose applicazioni:

- nella pratica clinica sono di supporto per la valutazione dei pazienti con un forte sospetto clinico di infezione e test molecolare negativo o inconclusivo, o in caso di non disponibilità del test molecolare (24) e in ambito pediatrico sono informativi per identificare un pregresso contatto con il virus. Inoltre, nei Paesi con limitate risorse sanitarie, in cui è difficile reperire ed eseguire test diagnostici molecolari, gli esami sierologici potrebbero essere utilizzati in supporto allo screening di popolazione;
- nella sorveglianza sanitaria per il tracciamento epidemiologico dell'infezione, per attuare azioni di protezione della salute degli operatori sanitari, dei pazienti e della popolazione in generale, e per valutare la possibilità di reinfezione.
- in ambito di politica sanitaria per controllare la diffusione della malattia, stimare l'efficacia delle strategie di contenimento dell'infezione, calcolare il rischio di trasmissione all'interno di una comunità, e valutare l'allocazione delle risorse disponibili;

Nel complesso, la determinazione non quantitativa degli Abs è particolarmente utile nelle indagini epidemiologiche per studiare, controllare e prevedere la diffusione del virus e l'andamento della pandemia, e la determinazione quantitativa e semi-quantitativa può essere utile per rilevare cambiamenti del titolo anticorpale e indirizzare le scelte diagnostiche successive, pur rimanendo non appropriati per lo screening di popolazione. In questo contesto, l'analisi dei Big Data può essere di supporto alla diagnostica e all'identificazione precoce dei soggetti infetti o ad alto rischio, e, come nel nostro studio, a migliorare l'efficacia delle scelte diagnostiche.

Il concetto Big Data fa riferimento ad un insieme

enorme di dati, di tale complessità da imporre l'uso di approcci analitici e statistici dedicati. Il metodo utilizza approcci computazionali avanzati per estrarre le informazioni dai dataset e costruire nuovi modelli di associazione. I dati possono provenire da diverse fonti (banche dati amministrative, cartelle cliniche elettroniche, studi epidemiologici), per cui è importante sviluppare un sistema di integrazione e analisi dei dati appropriato in modo che le informazioni siano affidabili e possano essere tradotte in decisioni cliniche appropriate.

La crescente disponibilità di dati e la maggiore capacità analitica hanno consentito di migliorare i risultati non solo in campo economico e finanziario, ma anche in sanità pubblica e nell'assistenza sanitaria migliorando i percorsi diagnostici, sviluppando modelli prognostici predittivi di malattia, personalizzando i regimi terapeutici; trovano anche applicazione anche nelle iniziative di prevenzione (25,26).

L'applicazione dell'analisi dei Big Data in sanità ha numerosi vantaggi in quanto consente di: integrare dataset differenti e costruire differenti algoritmi e modelli di apprendimento più complessi per trovare nuove associazioni genetiche, biologiche e cliniche (27); analizzare direttamente i dati provenienti dall'intera popolazione, superando l'approccio statistico che prevede l'analisi dei dati provenienti da un campione rappresentativo per poi fare inferenza sulla popolazione (anche se gli studi randomizzati controllati rimangono sempre il gold standard per studiare l'efficacia di un trattamento); studiare l'effetto dei trattamenti a lungo termine.

Questo approccio ha comunque dei limiti legati al fatto che l'analisi retrospettiva si scontra con l'elevata variabilità dei dati e assenza di standardizzazione nella raccolta delle informazioni. Questi limiti possono essere superati dall'utilizzo di sistemi computazionali adeguati che aiutino a ridurre gli eventuali bias presenti e rendano i dati più facilmente utilizzabili.

In conclusione, i risultati di questo studio sottolineano la scarsa utilità clinica della determinazione sierica delle IgM anti SARS-CoV-2 nella gestione del COVID-19 e pongono l'accento sulla responsabilità dei professionisti della medicina di laboratorio nel guidare la scelta dell'esame sierologico da eseguire, nel supporto all'interpretazione del risultato dell'esame, e nell'evidenziare i suoi limiti derivati dall'incertezza analitica e diagnostica.

Inoltre, i dati a disposizione dei professionisti sanitari continueranno a crescere nel tempo e la possibilità di integrare dati provenienti da fonti diverse e analizzarli con metodi analitici avanzati può accrescere valore nel percorso di cura del paziente e supportare il sistema sanitario.

BIBLIOGRAFIA

1. Lai CKC, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;538:226-30.
2. Voo TC, Clapham H, Tam CC. Ethical implementation of immunity passports during the COVID-19 pandemic. *J Infect Dis* 2020;222:715-8.
3. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, et al. The re-

- ceptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol* 2020;5:eabc8413.
4. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 2020;323:2249–51.
 5. Moura DTH, McCarty TR, Ribeiro IB, et al. Diagnostic characteristics of serological-based COVID-19 testing: a systematic review and meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2020;75:e2212.
 6. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for COVID-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2020;370:m2516.
 7. Lahner E, Dilaghi E, Prestigiacomo C, et al. Prevalence of Sars-Cov-2 infection in health workers (HWs) and diagnostic test performance: the experience of a teaching hospital in central Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:4417.
 8. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;6:CD03652.
 9. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M, et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine* 2020;62:103101.
 10. Klingler J, Weiss S, Itri V, et al. Role of IgM and IgA antibodies in the neutralization of SARS-CoV-2. *J Infect Dis* 2020;24:jiaa784.
 11. Viceconti M, Hunter P, Hose R. Big Data, Big Knowledge: Big Data for personalized healthcare. *IEEE J Biomed Health Inform* 2015;19:1209-15.
 12. Vidali M. I Big Data e la Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2021;45:13-14
 13. Guerranti R, Padoan, A, Angeletti D, et al. Introduzione ai Big Data e all'Intelligenza Artificiale in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2021; 45:57-67.
 14. Wong ZSY, Zhou J, Zhang Q. Artificial intelligence for infectious disease Big Data Analytics. *Infect Dis Health* 2019;24:44–8.
 15. Pecoraro V, Pirotti T, Trenti T, Plebani M., et al. The Big Data analysis application to evaluate the clinical utility of IgM anti SARS-CoV-2 determination: the experience of Modena. *Biochim Clin* 2021;45:S17.
 16. Trenti T, Pecoraro V, Pirotti T, et al. IgM anti-SARS-CoV-2-specific determination: useful or confusing? Big Data analysis of a real-life scenario. *Intern Emerg Med* 2021;16:2327-30.
 17. Vengesai A, Midzi H, Kasambala M, et al. A systematic and meta-analysis review on the diagnostic accuracy of antibodies in the serological diagnosis of COVID-19. *Syst Rev* 2021;10:155.
 18. Caini S, Bellerba F, Corso F. Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. *Euro Surveill* 2020;25:2000980.
 19. Pecoraro V, Casseti T, Meacci M, et al. Accuracy of the serological detection of IgG and IgM to SARS-Cov-2: a prospective, cross-sectional study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021;40:1891-8.
 20. Horn MP, Jonsdottir HR, Brigger D, et al. Serological testing for SARS-CoV-2 antibodies in clinical practice: A comparative diagnostic accuracy study. *Allergy* 2022; doi: 10.1111/all.15206.
 21. Carrillo J, Izquierdo-Useros N, Ávila-Nieto C, et al. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;538:187-91.
 22. Jiang S, Hillyer C, Dun L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol* 2020;41:355-9.
 23. Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, et al. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. *Immunity* 2020;53:524-32.
 24. Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, et al. Multisystem inflammatory syndrome in U.S. children and adolescents. *N Engl J Med* 2020;383:334-46.
 25. Raghupathi W, Raghupathi V. Big data analytics in healthcare: promise and potential. *Health Inf Sci Syst* 2014;2:3.
 26. Alonso SG, de la Torre Díez I, Rodrigues JJPC, et al. A systematic review of techniques and sources of Big Data in the healthcare sector. *J Med Syst* 2017;41:183.
 27. Kantarjian H, Yu PP. Artificial intelligence, Big Data, and cancer. *JAMA Oncol* 2015;1:573-4.

Extra-analytical Point of Care Testing errors in the pandemic era

Paolo Carraro, Haleh Afshar, Susanna Ferrarese, Ruggero Dittadi

Laboratory Medicine, dell'Angelo Hospital, Venice, Italy

ABSTRACT

Introduction: during the current SARS-CoV-2 pandemic phase, the use of rapid diagnostic devices outside the laboratory has expanded enormously, creating great opportunities but also new risks.

Methods: the present observational study evaluated the type and frequency of errors of the extra-analytical phases through an active search on all unclear or ambiguous cases. 252 241 rapid antigenic tests performed outside the laboratory in different health facilities over a 132-day period were considered. The requests, the patient demographics and the results were later entered manually onto the Laboratory Information System (LIS).

Results: through a number of data checks and internal reports, 2 556 cases of errors in the pre-examination phase were recorded, with a relative frequency of 12,274 parts per million (ppm). The vast majority of errors were observed in this phase; these were due mainly to computer communication problems induced by human errors that made the loading of results or the issuing of the reports difficult. The remaining cases involving erroneous personal data or patient identification amounted to 16 (64 ppm), confirming the relative safety of this phase in decentralized analysis. The errors identified in the post-examination phase were 540, with a relative frequency of 2140 ppm. The assessment of the severity of the errors with Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) allowed us to identify in particular, the attribution of the report to the wrong person (20 ppm) and the manual transcription of an incorrect result (20 ppm).

Discussion: this study contributes to the comprehension of the critical issues connected to the Point of Care Testing and made it possible to establish corrective actions: improving staff training, choice of instruments with reading devices and establishing direct computer connection for the entering of the requests and results to the LIS.

Key words: POCT, pre-analytical phase, antigenic testing

INTRODUCTION

In early 2020, health systems worldwide were subjected to an unprecedented challenge that also heavily involved clinical laboratories. In Italy, the spread of SARS-CoV-2 was earlier and more severe than in other western Countries implicating the need to activate additional resources since the end of February. This has involved point-of-care testing (POCT) diagnostics in particular in primary health care, with the aim of identifying the Coronavirus 19 disease (COVID-19) infections early before the patients' access to hospitals. The governance of the decentralized tests is traditionally a clinical laboratory expertise, and includes the choice of devices, the methods of identification of patients, the

analytical and quality control procedures and the issuing of valid reports. The reference documents on the topic are easily available and include guidelines from national and international scientific societies as well as regional regulations (1). The condition of emergency, and the allocation of instrumental and human resources in greater amounts than in any previous experience has led to choices that have often not been in accordance with the ordinary procedures. It should also be noted that quite often these initiatives were directed by the territorial authority of the health system which until then had cooperated on a very limited basis with the laboratories and their POCT governing procedures. Finally, there has been important political interventions in the choices proposed by the scientific experts, particularly when they

Corresponding author: Paolo Carraro, Medicina di Laboratorio Ospedale dell'Angelo, Azienda ULSS 3 Serenissima Via Paccagnella 11 30174 Mestre VE, Italy, E-mail pcarraro@hotmail.com

Ricevuto: 15.01.2022

Revisionato: 14.02.2022

Accettato: 18.03.2022

Publicato on-line: 11.04.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.016

disagreed each other.

A few months later, rapid antigenic tests have been activated in our territory (Venice province, Italy) for testing populations with a low probability of infection such as nursing homes, schools, prisons, travellers in transit, drive-through testing centres in various neighbourhoods, on boats to the lagoon islands and finally within the hospitals for both asymptomatic subjects in clinical departments and health personnel. Molecular tests were reserved to higher-risk subjects such as symptomatic and close contacts of infected patients.

POCT errors were only partially studied several years ago and the literature data are not consistent. However, there is strong evidence that the use of specific POCT in hospitals and in primary care increases the quality of patients care; on the other hand, there is also evidence that uncontrolled use of POCT can have far-reaching negative consequences for individuals as well as for public health (2). The practice of POCT is often not under the complete control of the laboratory and this consequently exposes the testing to the risk of non-adherence to recommended procedures. The risk of error depends on several parameters and in any case is greater from what is observed for the testing procedures performed in the laboratory (3). In 2003, Kost et al. classified the potential errors in the POCT into the different phases of the analytical process and observed how the pre-examination (pre-analytical) phase is less prone to errors due to immediacy and simplification of the POCT procedure. However, the question not yet resolved is whether or not this diagnostic methodology is ultimately safer than standard procedures (4).

Since the recent massive use of POCT for COVID-19 diagnostic, we have observed several defaults in the management of the data; their registration and an active prospective study in a defined period of time was then started, in order to obtain solid indications for improvement.

The aim of this study was the identification of the errors in the extra-analytical phases of the process, describing the type of errors and their frequency.

METHODS

Rapid antigenic tests were introduced in June 2020 and by the beginning of the second epidemic phase in Italy (October 2020) the entire process was well established. At each local testing site, administrative staff entered the requests and patient demographics onto the Laboratory Information System (LIS); nursing staff did the nasopharyngeal swabs and completed the tests; clinicians signed the results which were then manually entered onto the LIS by administrative staff at the central laboratory. For each subject, two bar code labels were produced: one for the test device and the other for the result registration sheet which cumulatively reported 10 tests from different subjects.

An immunochromatographic method was used for 87% of tests (mostly Panbio Covid-19 Ag Rapid test device, Abbott SRL, Rome, Italy) and an immunofluorescence

method was used for the remaining 13% (Standard F Covid-19 SD Biosensor Korea, from Relab SRL, Genova, Italy). A systematic review of the diagnostic characteristics of the two methods showed an average sensitivity of 75.1% and 88.1% and specificity of 99.5% and 99.1% respectively, when applied to symptomatic subjects. In the case of asymptomatic subjects, the average sensitivity was 48.9% and 69.2%, while specificity was 98.1% and 99.1% respectively (5).

When the immunofluorescence method was used, a bar code scanner for the sample identification was available and it was possible to print the test result. When the immunochromatographic method was used, the result was visible on the device for visual reading. In any case, after performing the test, the nurses reported the results (by visual reading or printed) on a registration sheet by ticking the pre-printed "positive" or "negative" boxes. The clinicians signed the sheets by checking the results and the sheets were then forwarded to the laboratory. Here, the sample check-in function of LIS was used and then the patient demographics and the results were manually entered onto the LIS.

Two training meetings were established: the first specific for the administrative staff and the second one dedicated to the nurses for the swab's obtainment and the analytical procedure. However, it was possible to train only a small number of personnel, given the elevated number of people involved and the workload pressure. Consequently, many operators have been trained by more expert colleagues rather than by the staff in charge of the training. This constitutes a limitation of the training accuracy.

Following an initial phase to fine-tune the errors active search strategy, the study was launched on October 7th 2020 and conducted for 132 consecutive days (until mid-February 2021) examining a total of 252 241 tests with an average of 1 911 tests per day (range 5 – 5 493). Table 1 shows the number of the test examined in the study, according to the different testing sites.

The design of the study involved the administrative staff, the nurses and, in some cases, the subjects themselves.

When the inspection of the data revealed a possible inaccuracy or incoherence, these were recorded in worksheets and an active investigation was started by reviewing the registration forms, consulting the computer traceability data, examining the requests and the reports or by interviewing people involved in the specific case, including the subjects in some circumstance. When it became necessary to correct personal information such as date of birth, city, address, postal code or more rarely, the name itself, we proceeded to a more precise identification of the subject through identity cards, according to standard procedures. The different types of errors thus identified were then divided in two main classes (pre- and post-examination).

Finally, an assessment of the clinical risks associated with the errors identified, was carried out using the Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) procedure, as described (6). For this purpose, at the end of the data collection,

Table 1
Number of tests in the different testing sites

Origin	Number	%
Venice airport passengers	18 618	7.4
Venice harbor passengers	3 728	1.5
Drive through testing	46 319	18.4
Prisons	1 935	0.8
Health personnel	40 237	16.0
Factory workers	1 859	0.7
Hospital in-patients	18 404	7.3
Residents and staff in old age homes	64 683	25.6
No close contacts of infected people	27 132	10.8
Preventive screening tests	25 739	10.2
Students and schools' staff	3 587	1.4
Total	252 241	100.0

a team involving a laboratory manager, an experienced nurse, the POCT coordinator, and an administrative operator was established. These professionals attributed risk values which were based on the collected information and on their clinical expertise and experience. This team was then able to calculate the overall Risk Priority Index of every single phase of the pre- and post-examination processes. It could be postulated that other types of mistakes could also have been made. For example, it is possible that an operator has incorrectly interpreted the coloured bands of the devices: the active search of errors used in this study could not detect this type of errors. However, this limitation does not affect the results here described.

RESULTS

The pre-and post-examination errors were 2 556 and 540 respectively. The particularly high number of errors in the pre-examination phase was caused by a specific issue. Actually, when the tests were repeated regularly for the same groups of people (such as guests of nursing homes), a transfer to the LIS of multiple requests at one time was activated through an Information Technology (IT) procedure to avoid the entering of the single requests. The procedure was particularly prone to errors and sometimes all the requests had to be removed and re-entered. All these errors have been assigned to the pre-examination phase. The overall incidence is therefore 12,274 parts per million (ppm) corresponding to 1.2%. Table 2 shows the errors classified as pre- and post-examination errors. The most common consequences of these errors have been delays in obtaining the reports and lack of communication with the computer systems appointed to the reports distribution or transmission to the personal health files. Errors in the identity of the subject have been found to be at greatest risk of diagnostic error or treatment, both for the patient himself and for her/his close contacts. A total of 5 cases were found, with the attribution of the result to the wrong person (frequency

20 ppm): this is not a particular high number, but they are of considerable severity. Less severe errors concerning the missing of some personal data, but without risk of mistaken identity, have been identified 11 times, frequency of 44 ppm. However, these led to a delay in the availability of the reports.

3 false negative and 2 false positive results have been observed (12 and 8 ppm, respectively) (post-examination phase, Table 2). These errors have been attributed to input errors because of the manual entry of data at the laboratory. These wrong results can produce detrimental effects since they may involve incorrect diagnoses, such as false negative subjects who continue to have social relationships, or false positive subjects put in isolation.

To also evaluate the severity of the errors in addition to their frequency, we analyzed the data with the Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) system (5) (Table 3). This type of analysis highlights that the steps of subject identification and manual input of so many results are the ones most at risk of causing negative consequences on patients.

These evaluations allowed us to establish corrective actions.

DISCUSSION

The topic of laboratory errors has been investigated for several years by studies considering the typical intra-laboratory workflow and only few papers are related to investigations carried out outside the laboratory (POCT). Two studies in particular have shown the relative frequencies of errors in an emergency laboratory in 1997 and 2007 respectively (7,8). In agreement with other studies, the most critical phase was found to be the pre-examination phase. In a special issue of *Chimica Clinica Acta*, Plebani M. discussed the safety of POCT analyses highlighting that, in theory, this tool eliminates some of the most problematic steps in the testing process, including specimen transport and conservation; the pre-examination phase was thus considered less

Table 2
Type of error and relative frequency in the pre- and post-examination phase

Phase	Type of error	Number	%	ppm
Pre-examination	1 requests not transmitted	2 540	1.01	10 070
	2 incorrect personal data	11	<0.01	44
	3 exchange with namesake	2	<0.01	8
	4 wrong identity	3	<0.01	12
	subtotal	2 556	1.01	10 133
Post-examination	5 missed registration sheet	29	0.01	115
	6 missing result	475	0.19	1 883
	7 result not readable	17	0.01	67
	8 double result *	14	0.01	56
	9 transcription error: negative result, positive reported	2	<0.01	8
	10 transcription error: positive result, negative reported	3	<0.01	12
	subtotal	540	0.21	2 140
Total		3 096	1.23	12 274

ppm, parts per million

* both positive and negative boxes are ticked in the result registration forms.

vulnerable compared to laboratory process (3). Despite the large number of studies available in searchable scientific papers with the terms “POCT error”, “POCT mistake”, “POCT risk management”, a limited number of publications included original error frequency data at different stages of the process. The performances of POCT technology have been adequately analyzed only in the field of analytical performance of several specific analysers but there is a lack of papers examining the extra-analytical phases.

The design of our study allows the identification of only a part of the errors, without the conceit of establishing their real quantity. Despite this, it offers an analysis of how to verify the extra-analytical safety level of the POCT. Our data were obtained directly in the field starting from interviews with healthcare professionals, patients or subjects and also from inconsistencies in the data registration systems. For this reason, they represent an underestimate of the real errors frequency. For example, the error of transcription of the qualitative result (from positive to negative or *vice versa*) was highlighted in detail (Table 3), but it was impossible to evaluate the errors of visual reading of the analytical result from the device by health professionals in the decentralized facility.

The overall incidence in the pre- and post-examination phases, compared with the data reported in the literature from automated systems linked to LIS, is not directly comparable to POCT process for various reasons: the different and simplified procedural phases, the qualitative results, the manual data management. However, it was possible to observe that errors in the patient identification phase are not far from those observed in POCT procedures: 64 ppm in the present study compared to

55 ppm in the laboratory flow in a College of American Pathologists study in 2006; on the other hand, in a 2012 Italian study that evaluated misidentification only among inpatients, the frequency was as higher as 352 ppm. (9,10). Unfortunately, at the best of our knowledge there are no more recent data related to this topic but the question of a safe patient identification remains critical in all medical disciplines (11). Our FMEA study also highlights the severity of this rare but dangerous type of error.

Referring to the post-examination phase of the POCT, it was possible to compare our data with a 2009 study that examined the manual transcription of the results obtained by nurses with portable glucose meters in a hospital environment (12). The frequency of errors in the post-examination phase in the present study is 2140 ppm compared to 31 776 ppm in the 2009 study. Very similar results have been obtained more recently in a hospital setting in Seattle (Washington, USA) when the transcription of results onto the computer system was carried out manually (13), with an overall frequency that has been estimated at 32 000 ppm. It becomes thus evident that if this activity is delegated to laboratory trained personnel (as in our study) instead of being disseminated among a number of nurses (as described in reference 10) the safety of the data increased substantially.

The diffusion of analytical decentralization in a vast territory has represented an unprecedented challenge, but also a tool for powerful containment of the pandemic.

Therefore, in conclusion, several considerations can be made in order to be prepared for possible future epidemics:

- strengthen the role of clinical laboratories in the POCT

Table 3

Assessment of the risks associated to the identified errors, according to FMEA .

Process phase	Step	Responsibility	Potential cause of failure	Effect of potential failure	Severity (1-10)	Occurrence (1-10)	Detection (1-10)	Risk Priority Index (RPI)
Pre-examination	Subject identification	POCT administrative staff	Choice of a namesake	Incorrect clinical decision, delay	9	1	4	36
			Wrong identity	Incorrect clinical decision, delay	9	1	4	36
			Incomplete personal data	Lab report not issued, delay	2	2	3	12
	Creating massive request files	IT staff	Incorrect date, test, bar code format	Check-in fault creating a new file, new labeling, delays	3	9	1	27
Post-examination	Sending of the result registration sheet	POCT administrative staff	Sheet not sent or missing	Lab report not issued	4	1	2	8
	Filling in of the registration sheet	POCT nurse	Result not ticked	Need of further information, considerable delay in issuing the report (or no report at all)	3	6	1	18
			Double result *		3	3	1	9
			Unreadable result		3	1	1	3
	Check in of result sheets in the LIS	Administrative and laboratory staff	Missed check in	Lab report not issued	3	1	2	6
	Loading results on the LIS	Administrative and laboratory staff	Wrong entry of a positive result	Isolation of the subject and his/her cohabitants	8	1	5	40
			Wrong entry of a negative result	Possible spread of the infection	9	1	5	45

FMEA, FAILURE MODE and EFFECT ANALYSIS; IT, information technology.

* both positive and negative boxes are ticked in the result registration forms.

- management;
- prefer, whenever possible, analytical systems connected online;
- promote continuous training of non-professional operators on the risks connected to POCT procedure focusing on identity errors;
- establish control filters and quality indicators.

It can be also noted that the data obtained in the present study endorse the proposals of the study group of the IFCC about the choice of quality indicators of the extra-analytical phases, with particular attention to the errors of identification of the patient and the attribution of the result (13).

The experience from this study guided some improvement actions for the future such as: more investments in training and connectivity; replacement of manual methods with those equipped with an instrument, bar code reader of the patient's code and transmission of the result directly to the LIS.

These choices will also make possible to reduce the number of full-time staff devoted to upload the results.

A final consideration is that our study concerns a specific test (rapid antigen test for COVID-19) and cannot be easily and fully applied to other types of POCT. The relevant information which can be widely extended, however, concerns the risks of manual management of data which is unfortunately a common practice for a high number of these tests situated in facilities where connectivity is lacking.

Acknowledgments

We thank the particular commitment of the administrative staff who actively participated in the collection and reporting of the relevant errors: Ms. Elisa Petrachi, Ms. Chiara Caridà, Ms. Valeria Malachini and Ms. Emma Tramontano.

CONFLICT OF INTEREST

None.

References

1. Rampoldi E, Patrucco G, Casati M, et al. Implementation and management of the point-of-care testing (POCT): essential indications. *Biochim Clin* 2021;45:312-26.
2. Florkowski C, Don-Wauchope A, Gimenez N et al. Point-of-care testing (POCT) and evidence-based laboratory medicine (EBLM) – does it leverage any advantage in clinical decision making? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017;54:471–94.
3. Plebani M. Does POCT reduce the risk of error in laboratory testing? *Clin Chim Acta* 2009;404:59-64.
4. Kost GJ. Preventing problems, medical errors, and biohazards in point-of-care testing. *Point Care* 2003;2:78–88.
5. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2021;3:CD013705.
6. Liu HC, Zhang LJ, Ping YJ et al. Failure mode and effects analysis for proactive healthcare risk evaluation: A systematic literature review. *J Eval Clin Pract* 2020;26:1320-37.
7. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 1997;43:1348-51.
8. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007;53:1338-42.
9. Valenstein PN, Raab SS, Walsh MK. Identification errors involving clinical laboratories: a College of American Pathologists Q-Probes study of patient and specimen identification errors at 120 institutions. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1106-13.
10. Carraro P, Zago T, Plebani M. Exploring the initial steps of the testing process: frequency and nature of pre-preanalytic errors. *Clin Chem* 2012;58:638-42.
11. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Managing the patient identification crisis in healthcare and laboratory medicine. *Clin Biochem* 2017;50:562-7.
12. Carraro P, Plebani M. Post-analytical errors with portable glucose meters in the hospital setting. *Clin Chim Acta* 2009;404:65-7.
13. Mays JA, Mathias PC. Measuring the rate of manual transcription error in outpatient point-of-care testing. *J Am Med Inform Assoc* 2019;26:269-72.
14. Plebani M, O'Kane M, Vermeersch P, et al. EFLM Task Force on "Performance specifications for the extra-analytical phases" (TFG-PSEP). The use of extra-analytical phase quality indicators by clinical laboratories: the results of an international survey. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:e315-7.

Diagnosi di crioproteinemia: preziosa collaborazione tra laboratorio e clinica per la corretta gestione di una patologia rara

Patrizia Natali¹, Daria Debbia¹, Joanna Sheldon², Alessia Bari³, Umberto Basile⁴, Francesca Lavatelli⁵, Dina Patel⁶, Massimo Galli⁷, Erica Villa⁸, Carlo Salvarani⁸, Giovanni Palladini^{5,9}, Maria Teresa Mascia³, Gilda Sandri³

¹Dipartimento Interaziendale Integrato di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Unità Sanitaria Locale e Azienda Ospedaliero – Universitaria Policlinico di Modena

²Protein Reference Unit, South West London Pathology, St. George's Hospital, London, UK

³Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

⁴Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

⁵Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia

⁶UK NEQAS Immunology, Immunochemistry & Allergy, Sheffield, UK

⁷Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "L. Sacco", Università degli Studi di Milano

⁸Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con interesse Trapiantologico, Oncologico e di Medicina Rigenerativa, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

⁹Medicina Generale 2 – Centro Amiloidosi Sistemiche e Malattie ad Alta Complessità, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

ABSTRACT

Diagnosis of cryoproteinemia: important collaboration between the laboratory and clinicians for the proper management of a rare disease.

Cryoglobulinemia is a rare pathologic condition that can be difficult to diagnose both clinically and in the laboratory, which is why close collaboration between the clinic and laboratory is essential. The laboratory needs the skills and experience to interpret the laboratory tests and the clinician should not hesitate to contact the laboratory when the result is not supported by the clinical signs. To strengthen this collaboration, the Protein Study Group of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC) in collaboration with the Italian Association for the Fight against Cryoglobulinemia (ALCRI) under the patronage of the University of Modena and Reggio Emilia, organised a conference in Modena on September 2021 entitled "Cryoglobulinemia: laboratory and clinic, a virtuous collaboration for the correct management of a rare pathology". This collective paper is aimed to summarize the topics discussed during the meeting. The conference consisted of two parts: the first aimed at highlighting the critical components of the pre-, intra- and post-analytical phases of cryoglobulin investigation. Cryoprotein testing remains totally manual and operator dependent so it was important to identify areas where best practice guidance or even harmonisation of the laboratory investigation would be beneficial. The second part of the conference focused on clinical aspects and the effects of therapies, including antiviral drugs with direct action against HCV. These drugs are able to eradicate the virus, but the elimination of HCV-related cryoglobulins is seen in only about half of cases. Finally, the clinical consequences of the diagnosis of cryoglobulinemia and the multidisciplinary implications that this entails were highlighted, underlining how the continuous dialogue between the laboratory and clinic is crucial for the correct management of the patient.

Parole chiave: crioproteine, crioglobuline, criofibrinogeno

Corrispondenza a: Patrizia Natali, Ospedale Civile di Baggiovara, Via P. Giardini, 1355 - 41126 Baggiovara di Modena (MO), E-mail p.natali@ausl.mo.it

Ricevuto: 19.01.2022

Revisionato: 01.02.2022

Accettato: 07.02.2022

Pubblicato on-line: 17.02.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.007

INTRODUZIONE

La crioproteinemia è una patologia rara, dovuta a proteine che precipitano nel sangue a freddo e che sono reversibilmente dissolubili a caldo. Quando le proteine coinvolte sono immunoglobuline si parla di crioglobulinemia, in caso in cui invece a precipitare siano il fibrinogeno e suoi derivati, si parla di criofibrinogenemia.

Le crioproteine sono state descritte per la prima volta nel 1933 in un paziente con mieloma (1), poi circa 40 anni dopo sono state evidenziate crioglobuline associate a infezioni virali, in particolare all'epatite C (HCV) (2).

Nel 1974 Brouet et al. (2) hanno proposto una classificazione delle crioglobuline, ampiamente utilizzata ancora oggi per la sua correlazione con le presentazioni cliniche, suddividendole in tipo I, II e III. Il tipo I o crioglobulinemia semplice (10% circa di tutte le crioglobuline) è costituito da immunoglobuline monoclonali di isotipo IgM o IgG, raramente IgA, associate a disordini immunoproliferativi. I tipi II e III sono crioglobulinemie miste, e rappresentano la maggior parte di tutte le crioglobulinemie. Il tipo II è costituito dall'associazione di una immunoglobulina monoclonale con immunoglobuline policlonali, mentre il tipo III è formato da immunocomplessi di Ig policlonali. La crioglobulinemia mista si manifesta prevalentemente in pazienti affetti da patologie infettive, spesso HCV-correlate, reumatologiche e autoimmuni.

La crioproteinemia è una patologia difficile da diagnosticare sia dal punto di vista clinico che da quello laboratoristico e proprio per questo è indispensabile una stretta collaborazione tra clinica e laboratorio. Questo deve avere a disposizione la diagnosi clinica, o l'ipotesi diagnostica, che consenta di valutare la coerenza con i risultati ottenuti, mentre il clinico non deve esitare a contattare il laboratorio quando il risultato ottenuto dal laboratorio non è supportato dalla clinica.

Per rafforzare la collaborazione laboratorio-clinica, il Gruppo di Studio Proteine di SIBioC in collaborazione con l'Associazione Italiana Lotta contro le Crioglobulinemie (ALCRI) con il patrocinio dell'Università di Modena e Reggio Emilia, ha organizzato un convegno a Modena il 28/09/2021 dal titolo "Crioglobulinemia: laboratorio e clinica, una collaborazione virtuosa per la corretta gestione di una patologia rara". Scopo di questo Documento è di riassumere il contenuto degli interventi tenuti durante l'incontro multidisciplinare.

Il convegno si è composto di due momenti: il primo rivolto ad evidenziare le criticità legate alle fasi pre- intra e post-analitica della determinazione della crioglobulina, fornendo elementi per l'armonizzazione di una analisi ancora oggi totalmente manuale e quindi soggetta a variabili operatore-dipendente.

La seconda parte del convegno ha invece maggiormente trattato gli aspetti clinici e gli effetti delle terapie, tra cui anche i farmaci antivirali ad azione diretta contro l'HCV. Tali farmaci sono in grado di eradicare il virus, ma solo in circa la metà dei casi questo si

accompagna all'eliminazione delle crioglobuline HCV-relate.

Si sono infine messe in luce le ricadute cliniche della diagnosi di crioglobulinemia e le implicazioni multidisciplinari che questo comporta, facendo risaltare come il continuo dialogo tra laboratorio e clinica sia cruciale per la corretta gestione del paziente.

IL RUOLO DEL LABORATORIO

Il laboratorio ha un ruolo centrale nel rilevare una crioglobulinemia, caratterizzarla e quantificarla (3-5). A fronte dell'importanza di questo processo nella gestione clinica del paziente, l'analisi delle crioglobuline presenta tuttavia criticità a diversi livelli e richiede l'adozione di specifiche precauzioni per evitare la perdita di analita e garantire una corretta interpretazione dei risultati.

Fase pre-analitica

La fase preanalitica rappresenta un elemento di criticità per la difficoltà di mantenere il campione alla temperatura di 37 °C dal momento del prelievo fino all'arrivo in laboratorio, per evitare la precipitazione di crioglobuline che in taluni casi può iniziare già a temperatura ambiente. Tale rischio è più elevato per le crioglobuline di tipo I che per le crioglobulinemie miste dei tipi II e III. Per questo motivo è opportuno utilizzare provette preriscaldate, senza gel separatore, e trasportare il campione in contenitori che evitino la dispersione di calore (contenitori riempiti di acqua/sabbia/biglie calde, contenitori isotermitici), mantenendo la temperatura a 37 °C. Il volume di campione deve essere sufficiente per consentire il rilievo di precipitati anche se presenti in piccole quantità; si raccomanda di prelevare 10-15 mL di sangue, per ottenere almeno 4-5 mL siero.

La temperatura deve essere mantenuta a 37 °C anche durante la fase di separazione, che deve avvenire in incubatore per almeno 30 minuti, preferibilmente 2-3 ore. Ove possibile, anche la centrifugazione dovrebbe essere effettuata in centrifuga termostata.

Fase analitica

Dopo la separazione, il siero deve essere trasferito in una nuova provetta, e la precipitazione delle crioglobuline si ottiene a freddo, mantenendo il campione a 4 °C per 5-7 giorni, con controllo giornaliero. Parte del campione deve essere trasferito anche in tubo di Wintrobe per la successiva quantificazione del criocrito. Il processo di precipitazione si manifesta in modo variabile e dipende dalla concentrazione e dal tipo di crioglobulina. La presenza/assenza di crioprecipitato è valutata mediante ispezione visiva. Il crioprecipitato può presentarsi con struttura diversa: amorfo, criogel, cristallina, dipende dall'isotipo delle immunoglobuline coinvolte, dalla concentrazione e dalla temperatura di precipitazione. La natura del precipitato può essere confermata riscaldando il campione a 37 °C: la

precipitazione delle crioglobuline è reversibile ed il precipitato si dissolve a caldo.

La caratterizzazione del crioprecipitato permette poi di caratterizzare le immunoglobuline presenti e deve essere preceduta da accurato lavaggio mediante tampone fosfato o fisiologica, per rimuovere le proteine sieriche residue con almeno 3 lavaggi a freddo. La caratterizzazione del crioprecipitato dissolto è comunemente effettuata mediante elettroforesi ed immunofissazione (IFE) su gel di agarosio. La quantificazione del precipitato è in genere espressa mediante valutazione quantitativa del criocrito, inteso come percentuale di crioprecipitato rispetto al volume totale, dopo centrifugazione del tubo di Wintrobe.

Fase post-analitica

La classificazione delle crioglobuline è più comunemente effettuata seguendo la classificazione proposta da Brouet (2), che ne distingue tre tipi: tipi I-II-III. Gli isotipi più frequenti nelle crioglobulinemie miste sono IgM ed IgG, ma possono associarsi a queste forme anche IgA mono o policlonali. Le crioglobuline sono tuttavia analiti complessi, la cui microeterogeneità rende spesso difficile aderire alla classificazione sopra riportata. Nel corso degli anni sono state proposte classificazioni integrative quali le classificazioni di Tissot, Pontet, Musset, Passerini-Basile (4).

L'indagine completa per la crioproteinemia richiede almeno 7 giorni, un impegno manuale significativo e la necessità di attrezzature come incubatori e centrifughe a temperatura controllata. Si tratta di indagini di approfondimento la cui gestione richiede competenze tecniche e professionali specialistiche, che necessitano di tempi di esecuzione e di interpretazione non compatibili con quanto consolidato in attività analitiche di alta produttività.

Tabella 1

Determinazione e caratterizzazione delle crioproteine (crioglobuline e criofibrinogeno)

Fase preanalitica

Prelievo:

- prelevare 10-15 mL di sangue in provetta senza gel separatore (siero) per la ricerca delle crioglobuline e 10-15 mL di sangue in provetta con EDTA (plasma) per la ricerca del criofibrinogeno;
- riporre immediatamente a 37 °C;
- lasciar coagulare il sangue a 37 °C (almeno 30 minuti); centrifugare a 37 °C; separare immediatamente il siero/plasma in tubo di Wintrobe e incubare a 4 °C (siero/plasma) per almeno 5-7 giorni.

Fase analitica

Valutazione del crioprecipitato:

- osservare l'eventuale presenza nel siero/plasma di precipitati, flocculati o gel dopo 5-7 giorni di incubazione a 4 °C;
- verificare la reversibilità della crioprecipitazione ponendo il siero/plasma a 37 °C.

Misurazione del criocrito:

- rapporto percentuale tra volume di crioprecipitato e volume di siero/plasma dopo centrifugazione del tubo di Wintrobe a 2000 rpm per 15'.

Caratterizzazione del crioprecipitato:

- 3 cicli di lavaggio a 4 °C con soluzione fisiologica o tampone fosfato, centrifugazione a 2000 rpm per 15 min a 4 °C;
- dissolvere il precipitato mediante incubazione a 37 °C (solo per le crioglobuline trattate con sostanze riducenti).
- tipizzare mediante immunofissazione su gel d'agarosio utilizzando antisieri anti IgG, IgA, IgM, κ totali, λ totali (per le crioglobuline) e anti fibrinogeno (per criofibrinogeno).

Fase post-analitica

Valutazione del risultato:

- interpretazione delle immunofissazioni;
- utilizzare la classificazione secondo Brouet (quella maggiormente utilizzata) per le crioglobuline e verificare la presenza della banda in corrispondenza dell'antisiero anti-fibrinogeno per il criofibrinogeno

Criofibrinogeno

Il criofibrinogeno è una crioproteina che precipita nel plasma e non nel siero, alla temperatura di 4 °C e si discioglie alla temperatura di 37 °C. Il prelievo deve avvenire utilizzando una provetta con anticoagulante diverso dall'eparina per evitare la formazione della frazione eparino-precipitabile che potrebbe essere confondente. Il criofibrinogeno è costituito principalmente da fibrinogeno, fibronectina, fibrina, ma può contenere anche altre proteine. Per la determinazione del criofibrinogeno è necessario avere a disposizione sia la provetta di plasma che di siero a 4 °C: se il precipitato si forma solo nella provetta di plasma si è in presenza di criofibrinogeno, se si forma sia nella provetta di plasma che nel siero, è possibile il riscontro di criofibrinogeno e/o crioglobuline. In questi casi è necessario effettuare una IFE con antisiero anti fibrinogeno per confermarne la presenza (6).

Il criofibrinogeno, ricercato in pochi laboratori, è un parametro non inserito nei livelli essenziali di assistenza (LEA) quindi raramente richiesto dai clinici. La criofibrinogenemia presenta situazioni cliniche sovrapponibili alla crioglobulinemia e pertanto è un parametro utile, ma poco indagato, nella diagnosi di vasculite, specialmente quando la ricerca di crioglobuline risulti negativa.

Studi preliminari mostrerebbero una correlazione tra criofibrinogenemia e sclerosi sistemica (dati presentati al convegno di Modena il 28/09/2021, non pubblicati).

Le fasi del processo di laboratorio per la determinazione della crioglobulinemia sono riassunte nella Tabella 1.

Criticità dell'interpretazione dei risultati

L'interpretazione delle IFE rappresenta una criticità: richiede un'elevata esperienza, è operatore dipendente ed è fondamentale per garantire la riproducibilità dei risultati.

Nell'ambito di un progetto pilota per la valutazione della variabilità inter- e intra-laboratorio nella refertazione delle crioglobuline, condotto in Emilia Romagna a cui hanno partecipato 8 laboratori e 13 operatori, sono stati inviate 30 immagini di IFE di crioglobuline, ogni operatore ha fornito il proprio risultato e i dati sono stati successivamente elaborati (7). Per misurare la concordanza tra le letture di IFE dei diversi operatori, si è arbitrariamente determinata una scala di valutazione definendo "ottima" una concordanza del 100%, cioè quando tutti gli operatori fornivano un'unica definizione per lo stesso gel, "buona" una concordanza compresa tra 75 e 99%, cioè quando la stessa risposta era fornita dal 75-99% degli operatori, "sufficiente" tra 50 e 74% e "scarsa" se <50%. La definizione di IFE non valutabile è stata riscontrata in 35 risposte su 390 (9,0%) relativamente a 12 gel su 30. Delle 30 IFE sottoposte a valutazione, solamente 3 (10%) sono state classificate nello stesso modo da tutti e 13 gli operatori con una concordanza ottima dei risultati pari al 100%; 10 (33%) presentavano una concordanza buona, 14 (47%) sufficiente, mentre 3 (10%) scarsa.

Per quanto riguarda la concordanza tra i 13 operatori partecipanti, si è assunto in modo arbitrario che questa possa essere considerata accettabile quando almeno il 75% degli operatori concorda sul tipo di crioglobulina da attribuire allo stesso campione; i risultati ottenuti mostrano come solo nel 43% dei casi venga raggiunto il requisito di accettabilità. Dalla casistica valutata è emerso in particolare un campione a cui sono stati attribuiti 5 differenti tipi di risposta: crioglobulinemia di tipo I, tipo II, tipo III, non valutabile, negativo a seconda dell'operatore che lo aveva visionato.

In questo studio si è in particolare focalizzata l'attenzione sull'incidenza della fase post-analitica sulla variabilità del dato. I risultati evidenziano come anche la sola lettura dell'IFE rappresenti, nella valutazione della crioglobulina, un elemento di elevata criticità altamente operatore-dipendente.

È importante portare alla luce le complessità riscontrate dal laboratorista in ogni fase nella determinazione delle crioglobuline, affinché anche il clinico ne sia consapevole e porti il proprio contributo nella diagnosi di crioglobulinemia stringendo una forte collaborazione con il laboratorio.

In seguito ai risultati dello studio pilota eseguito in Emilia Romagna (7), SIBioC ha promosso un sondaggio inviato ai laboratori italiani. I laboratori che hanno risposto al questionario sono stati 66 e dai dati ottenuti emerge come la qualità del processo analitico sia critica. Le condizioni preanalitiche ed analitiche, gli approcci per l'identificazione ed i criteri per la quantificazione spesso differiscono da laboratorio a laboratorio, limitando accuratezza e riproducibilità dell'analisi. Le problematiche

maggiori sono rappresentate dalla difficoltà del mantenimento della catena del caldo dal prelievo alla presa in carico del laboratorio, dalla diversa dotazione tecnologica tra laboratori, dall'alto livello di manualità dell'intero processo ampiamente operatore-dipendente, dall'assenza di una metodica e di riferimenti univoci e armonizzati, e dalla diversità di criteri adottati per riportare il risultato.

Il controllo di qualità

Considerando l'importanza clinica delle indagini sulle crioproteine, sorprende come questi esami siano ad oggi eseguiti senza linee guida e protocolli condivisi e, fino al 2017, senza alcuna valutazione esterna di qualità (VEQ). Non ci sono prove solide che esista una problematicità relativamente alla determinazione delle crioproteine, tuttavia, talvolta emergono incongruenze tra le indagini di laboratorio e la clinica di alcuni pazienti.

L'UK National External Quality Assurance Scheme (UK-NEQAS) per l'immunologia, l'immunochimica e l'allergologia (IIA) ha istituito una VEQ anche per l'analisi delle crioproteine. Questo schema permette di raccogliere dati sulle modalità operative adottate nei laboratori relativamente all'analisi delle crioproteine, valutare la loro competenza, educare i partecipanti alle buone pratiche e, in definitiva, migliorare la ricaduta del risultato fornito dai laboratori sui pazienti.

La VEQ pilota è stata introdotta nel 2017 (8); ogni anno vengono distribuite 4 immagini di IFE ottenute da reali richieste di crioproteine. Ogni distribuzione include un'anamnesi del paziente con immagini di siero e plasma incubati a 37 °C e 4 °C (Figura 1), la misurazione delle immunoglobuline, del complemento C3 e C4, del fattore reumatoide (FR) e l'elettroforesi delle proteine sieriche. Il partecipante deve quindi valutare se è presente una crioproteina e se sono necessarie ulteriori indagini. Infine viene chiesto di commentare il tipo di crioproteina valutata. La VEQ include campioni provenienti da soggetti sani e campioni positivi per le crioproteine di tipo I, II e criofibrinogeno.

I risultati iniziali, poco soddisfacenti, hanno destato qualche timore sulla qualità delle immagini inviate. Nei campioni con una crioglobulina di tipo I è stata osservata la percentuale più elevata di identificazione (79%) mentre il criofibrinogeno è stato individuato solo dal 28% dei partecipanti. È preoccupante come il 18% dei partecipanti abbia identificato una crioproteina in un campione completamente negativo. I rapporti della VEQ includono commenti dettagliati che evidenziano i risultati ottenuti.

UK NEQAS IIA ha inoltre organizzato due sessioni educative le "Cryoprotein Masterclass", focalizzando l'attenzione dei partecipanti sull'importanza clinica di queste indagini e fornendo informazioni sulle buone pratiche per l'esecuzione dell'analisi delle crioproteine. Con il tempo si è rilevato un graduale miglioramento dei risultati ed un aumento del numero di partecipanti che identificano correttamente le crioproteine.

UK NEQAS IIA continuerà con questo importante programma di VEQ e sta pianificando ulteriori sessioni di

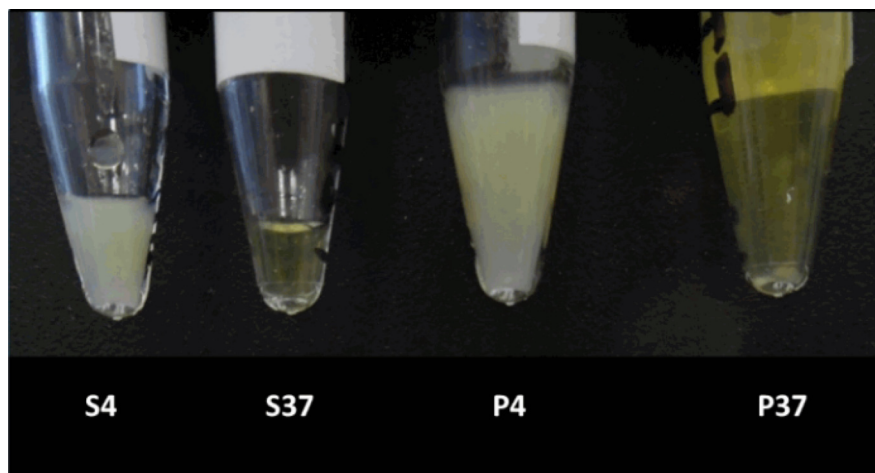


Figura 1

Esempio di una immagine usata all'interno del "UK NEQAS Cryoproteins Scheme", pubblicata con l'autorizzazione del UK NEQAS Immunology, Immunochemistry & Allergy (IIA).

Masterclass per il futuro. Questo è il primo ed unico programma attualmente in essere di VEQ sul riconoscimento e la tipizzazione delle crioproteine. Partecipare a tale programma è essenziale per i laboratori che eseguono questa tipologia di esami.

I biomarcatori associati a crioglobulinemia

La crioglobulinemia di tipo II e tipo III o crioglobulinemia mista è una malattia multifatoriale in cui sono implicate diverse cause: genetiche, ambientali e immunologiche, collegate allo sviluppo di questo disturbo. In particolare la crioglobulinemia mista è associata a patologie infiammatorie croniche quali l'HCV (5).

Si è dimostrato su modelli murini come gli immunocomplessi formati da IgG₃ siano i precursori dei fenomeni crioprecipitativi delle crioglobuline miste. L'IgG₃, infatti, esplica una importante funzione di anticorpo pro-infiammatorio. L'IgG₃ nei crioprecipitati e negli anticorpi anti nucleo (ANA) potrebbe indicare che il sistema immunitario è stimolato a un grado di attivazione più elevato e questo può rappresentare un fattore scatenante nell'attivazione a lungo termine del meccanismo autoimmune. Un aumento di IgG₃ è anche correlato all'attività del FR contro il complesso IgG₁-HCV. Pertanto, l'identificazione precoce di IgG₃-FR in pazienti con HCV potrebbe essere utilizzata come un predittore precoce dello sviluppo di crioglobulinemia mista (9).

Nel caso di pazienti con infezione da HCV, anomalie nei livelli sierici di catene leggere libere delle immunoglobuline (FLC) e del loro rapporto suggeriscono l'attivazione policlonale o monoclonale delle cellule B indotta dal virus. Elevate concentrazioni di FLC-κ sono state trovate in pazienti HCV-positivi con crioglobulinemia di tipo II, caratterizzati da una componente monoclonale FLC-κ il cui livello sierico è stato recentemente utilizzato per monitorare manifestazioni extraepatiche causate da HCV. La quantificazione delle FLC potrebbe essere

utilizzata sia come marcatore diagnostico di vasculite/sindrome da crioglobulinemia mista, sia come nuovo indicatore per identificare i pazienti che necessitano di un accesso urgente al trattamento antivirale. L'alterazione del rapporto FLC- κ/λ è correlato alla gravità delle condizioni cliniche associate ai disturbi linfoproliferativi a seguito di infezione da HCV, dalla vasculite al linfoma non Hodgkin (NHL). Le FLC potrebbero segnalare l'attività di cloni di cellule B "dormienti" ed essere utili per identificare la malattia minima residua, indicativa di una possibile recidiva o peggioramento in pazienti con crioglobulinemia mista HCV relata dopo il trattamento con rituximab (RTX). Nei campioni di pazienti con crioglobulinemia di tipo II HCV-relata, si possono osservare livelli aumentati di IgM-κ che tendendo a sopprimere l'isotipo IgM-λ non coinvolto. Rapporti IgM-κ/IgM-λ anomali sono stati segnalati come associati a esiti negativi in pazienti con NHL a cellule B (10).

Nei soggetti asintomatici, i biomarcatori suindicati consentono il rilevamento delle fasi iniziali di una crioglobulinemia mista, e sono utili nelle fasi di monitoraggio per confermare l'eventuale evoluzione verso una patologia maligna o benigna. Nella diagnosi del NHL correlato all'HCV, i biomarcatori possono avere un ruolo predittivo prognostico ed essere utili nella scelta di strategie di trattamento mirate. La presenza di bassi livelli di crioglobuline (~0,05 g/L) in pazienti non HCV si è dimostrata essere un possibile indicatore di complicanze renali e neurologiche, con valori significativi di morbilità e mortalità. Le manifestazioni cliniche e la presenza di autoanticorpi nell'infezione cronica da HCV possono facilmente indurre erroneamente a diagnosticare malattie autoimmuni classiche; la possibilità di utilizzare biomarcatori sierologici precoci di crioglobulinemia mista potrebbe essere cruciale per segnalare e controllare in modo efficace le manifestazioni extraepatiche (11).

I disordini del sistema immunitario sono indubbiamente coinvolti nel processo patogenetico della

crioglobulinemia mista, mostrando un aspetto dicotomico: si può osservare un viraggio verso una malattia linfoproliferativa o una patologia autoimmune, e la crioglobulinemia mista può essere considerata il risultato della risposta immunitaria adattativa, indotta dalla persistenza di stimoli endogeni (malattie autoimmuni) o esogeni (virus). Poiché la loro presenza aumenta le co-morbilità e riduce la sopravvivenza, è importante rilevare la presenza di crioglobuline nei pazienti con alterazioni immunologiche. La diagnosi precoce di una crioglobulinemia può evitare il peggioramento dell'evoluzione da una forma lieve di vasculite a una malattia più grave che talora può avere esiti infausti (10).

IL RUOLO DEL CLINICO

Crioglobulinemia di II e III tipo o crioglobulinemia mista

La crioglobulinemia mista è quella maggiormente diffusa rappresentando circa l'85%-90% di tutte le crioglobulinemie rilevate. La principale manifestazione della crioglobulinemia mista è costituita dalla vasculite crioglobulinemica che si caratterizza dal punto di vista clinico da una triade sintomatologica, denominata triade di Meltzer-Franklin, costituita da porpora, astenia ed artralgia (12). Nonostante questa triade si manifesti nella maggior parte dei pazienti, in realtà lo spettro sintomatologico della vasculite crioglobulinemica è molto più ampio e vede la presenza di diversi sintomi con una frequenza estremamente variabile (13).

Per quanto riguarda la crioglobulinemia mista non HCV-correlata, il quadro sintomatologico è pressoché analogo, nonostante lo scenario clinico rispecchi soprattutto la diagnosi principale, in particolare per quanto riguarda la crioglobulinemia mista che si manifesta in corso di connettivite (14). È importante considerare che esistono anche pazienti con crioglobulinemia mista totalmente asintomatici e pazienti con vasculite crioglobulinemica franca senza crioglobuline rilevabili nel siero; quest'ultimo caso si pensa possa essere legato al fatto che la precipitabilità degli immunocomplessi può dipendere da diversi fattori, per cui durante la determinazione laboratoristica, nonostante la presenza di crioglobuline, la precipitazione non avvenga. In alternativa, la difficoltà pre-analitiche e post-analitiche legate alla metodica di laboratorio potrebbero alterare i risultati. In questi casi, se il clinico ha un forte sospetto di sindrome crioglobulinemica, è molto importante eseguire determinazioni multiple e seriate nel tempo in modo da caratterizzare al meglio il quadro sierologico del paziente, considerando anche il fatto che la presenza di criofibrinogeno può provocare quadri clinici simili alla sindrome crioglobulinemica (15). Il motivo per cui alcuni pazienti con crioglobulinemia mista non hanno alcuna manifestazione clinica è da riferirsi al fatto che sicuramente sono coinvolti fattori ambientali e/o genetici non del tutto noti (12).

La manifestazione cutanea più frequente è la porpora palpabile agli arti inferiori, generalmente ortostatica ed

intermittente. Come conseguenza dei ripetuti fenomeni di porpora, l'emosiderina si accumula a livello sottocutaneo conferendo alla cute un'iperpigmentazione brunastra, reperto che è considerato diagnostico anche in assenza di porpora in atto (12). L'estensione e l'entità delle lesioni possono dipendere anche dalla presenza di cofattori quali l'insufficienza venosa cronica, lo stress fisico, la postura seduta protratta e il clima afoso (13).

Il fenomeno di Raynaud è un'altra manifestazione cutanea relativamente frequente a cui si associa, nel 50-60% dei casi un pattern videocapillaroscopico caratterizzato da un aumento del numero di capillari ed un aumento della loro tortuosità (12).

La xerostomia e la xeroftalmia si manifestano circa nel 50% dei pazienti, ma solo la metà di questi riesce a raggiungere la diagnosi di sindrome di Sjögren. Da non dimenticare che classicamente questo tipo di manifestazioni è correlato all'infezione cronica da HCV (16).

Altre manifestazioni cutanee degne di nota sono le ulcere cutanee, che tendono difficilmente alla guarigione, la livido reticularis, l'orticaria da freddo e la gangrena digitale (12).

Le due manifestazioni muscolo-scheletriche più frequenti sono l'astenia e l'artralgia. Al quadro clinico del paziente può sovrapporsi anche un quadro di artrite non erosiva generalmente oligoarticolare, di tipo lieve, spesso migrante. In una quota minore di pazienti è stata identificata la presenza di mialgie o di fibromialgia franca (13).

Circa nel 60% dei pazienti con vasculite crioglobulinemica si manifesta un quadro di neuropatia assonale sensitivo-motoria che provoca dal punto di vista sintomatologico parestesie e sensazione di bruciore, soprattutto a carico degli arti inferiori, con tipica distribuzione a calza, ma anche agli arti superiori con distribuzione a guanto (12). Sono state rilevate, inoltre, alterazioni di tipo neurocognitivo e neuropsichiatrico: nell'86% dei pazienti esaminati si aveva un deficit a carico di uno o più dei dieci domini cognitivi (17). Sono state rilevate anche disfunzione sessuale, stress emotivo, un aumentato rischio di depressione, ansia, somatizzazione e insicurezza, così come stanchezza e disturbi del sonno (17).

Circa la metà dei pazienti sviluppa un coinvolgimento renale durante la malattia, che varia da una sindrome nefrosica e una glomerulonefrite membrano-proliferativa a manifestazioni meno frequenti quali la glomerulosclerosi e l'insufficienza renale terminale. Come conseguenza del danno renale si possono rilevare ipertensione arteriosa, proteinuria di grado variabile, microematuria, cilindri granulari e/o eritrocitari e aumento dei livelli di creatinina. Il danno renale, quando manifesto, è un fattore che può peggiorare la prognosi della malattia (13).

Visto che nella stragrande maggioranza dei casi di crioglobulinemia mista è coinvolta l'infezione da HCV, molto spesso coesiste una epatite cronica evidente generalmente di grado lieve-moderato. L'epatite cronica può assumere un aspetto tale da mettere a rischio la vita del paziente, soprattutto quando si associa al coinvolgimento renale; in generale il suo decorso è meno

grave rispetto a quello della popolazione generale HCV positiva e si associa anche meno frequentemente all'evoluzione verso un carcinoma epatocellulare (HCC) (15).

I pazienti con crioglobulinemia mista HCV-correlata con o senza vasculite, tra le manifestazioni extraepatiche, presentano con una frequenza relativa, disordini tiroidei e diabete mellito di tipo 2. L'infezione da parte di HCV dei tireociti e delle cellule β pancreatiche provoca una up-regolazione della secrezione di CXCL10 e il reclutamento di linfociti Th1 che, in soggetti geneticamente predisposti, rispondono con un aumento della produzione di interferone γ e di TNF α che a loro volta sostengono e stimolano la secrezione di CXCL10 da parte delle cellule bersaglio; questo meccanismo autoperpetua un circolo vizioso che alla fine provoca la comparsa di tiroidite autoimmune e diabete mellito di tipo 2 (15).

L'interessamento che la malattia può avere a livello polmonare è dovuta probabilmente allo sviluppo di fenomeni vasculitici a livello dei piccoli vasi polmonari e può manifestarsi in diversi modi con una dispnea da sforzo, tosse secca o produttiva, alveolite emorragica, fibrosi polmonare interstiziale con o senza effusione pleurica e sono stati descritti anche casi di polmonite interstiziale criptogenica (12).

La vasculite gastrointestinale si manifesta per l'interessamento dei piccoli e medi vasi e provoca dal punto di vista sintomatologico dolore addominale e feci striate di sangue, mimando un addome acuto, oppure franchi quadri di perforazione intestinale; spesso questi pazienti subiscono erroneamente la diagnosi di pancreatite acuta e colecistite (15).

La sindrome da iperviscosità è una manifestazione che colpisce principalmente gli individui affetti da crioglobulinemia di tipo I, piuttosto che quelli di tipo II e tipo III (12). Il quadro sintomatologico della sindrome da iperviscosità si caratterizza per visione offuscata, epistassi ricorrente, cefalea, tinniti, vertigini e capogiri. Se il quadro diventa severo i pazienti possono accusare confusione, atassia e insufficienza cardiaca (12).

L'interessamento dell'apparato cardiovascolare e l'osteosclerosi sono stati riportati occasionalmente (12).

Crioglobulinemia di I tipo o crioglobulinemia semplice

Le crioglobulinemie di tipo I che rappresentano il 10-15% del totale, sono costituite da una immunoglobulina monoclonale (MIg), generalmente IgG o IgM, raramente IgA o catene leggere. Sono solitamente associate a neoplasie linfoproliferative a cellule B con secrezione proteica prevalente, quali mieloma multiplo (MM), macroglobulinemia di Waldenström (MW), leucemia linfatica cronica (LLC) ma anche LNH o condizioni benigne/pre-neoplastiche come gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) e non strettamente correlate a infezioni da virus HCV. Diversamente da quelle di tipo II e III, le crioglobuline tipo I in genere non hanno attività di FR e non provocano consumo del complemento (C4); possono però

provocare iperviscosità plasmatica per gli alti livelli di MIg circolante e conseguente ostruzione fisica dei piccoli vasi con la formazione di trombi. Quantitativamente la concentrazione della crioglobulina tipo I è maggiore rispetto alla crioglobulina di II e III tipo. Un criocrito elevato però non sempre sottende un quadro patologico o con sintomatologia severa, seppure sia più frequente nella malattia sintomatica. La formazione del crioprecipitato di crioglobuline tipo I solitamente avviene entro poche ore dall'esposizione a basse temperature, quindi rispetto al tipo II e III precipita più rapidamente ed a temperatura più alta quanto più alta è la concentrazione. L'aggregazione non è dovuta alla formazione di immunocomplessi (diversamente dagli altri due tipi) ma alla ridotta solubilità a basse temperature.

In vivo le crioglobuline monoclonali possono associarsi reversibilmente tra loro, quando in alta concentrazione e contribuire alla patologia. In seguito al riscontro della presenza di crioglobuline tipo I la tipizzazione del crioprecipitato permette di ipotizzare la patologia linfoproliferativa sottostante e la quantificazione consente di valutare il rischio di danno d'organo, l'evoluzione e la eventuale risposta al trattamento. Il sospetto di una neoplasia ematologica di tipo linfoproliferativo, permane anche in presenza di una crioglobulina tipo II in cui la IgM monoclonale abbia un'attività di FR, condizione più spesso rilevabile nella MW (18).

La crioglobulinemia di I tipo può essere asintomatica (19), ma quando sono presenti segni e sintomi, questi sono la conseguenza dell'occlusione vascolare dovuta alla formazione del crioprecipitato, ma la presentazione clinica può assumere anche le caratteristiche tipiche della vasculite dei piccoli vasi. Prevalgono le manifestazioni cutanee (69-86%) a localizzazione acrale (estremità inferiori, naso, orecchie) come porpora, livedo reticularis, fenomeno di Raynaud, acrocianosi, necrosi cutanea, ulcere. Può esservi coinvolgimento renale (30%) come proteinuria, ematuria microscopica, insufficienza renale, glomerulonefrite membranoproliferativa, sindrome nefrosica, o manifestazioni neurologiche (19-44%) quali neuropatia periferica (anche dolorosa) prevalentemente sensitiva ma anche motoria. Talvolta sono presenti artralgie (28%) o sindrome da iperviscosità (epistassi, blurred vision, ipoacusia improvvisa, cefalea, confusione) (18).

Non è semplice individuare un dato di incidenza delle crioglobuline tipo I nelle neoplasie ematologiche. In una pubblicazione del gruppo di Rochester (18) è riportata una delle più recenti e ampie casistiche retrospettive di pazienti con crioglobulinemia, con 486 pazienti crioglobuline positive in 26 anni (1990-2015) di cui 102 con crioglobuline tipo I (22%), criocrito mediano alla diagnosi di 7,5% (0-96), 53% IgG, 39% IgM. In uno studio di Muchtar et al., (20) sulla MW, malattia linfoproliferativa caratterizzata dalla presenza di linfoplasmociti clonali che producono IgM monoclonale, viene riportato come in una popolazione di 595 MW le crioglobuline sieriche siano presenti nel 5,5% dei casi, seppure non viene chiaramente specificato il tipo di crioglobuline (21).

Altra patologia oncoematologica che può presentarsi associata a crioglobuline è il MM, ma anche in questo caso non emerge chiaramente quale sia il reale peso/incidenza delle crioglobuline, la cui presenza però può determinare, ad esempio, lesioni cutanee, non facenti parte del corteo sintomatologico del MM (18). Nei pazienti affetti da LLC a cellule B non infrequente è il riscontro di una MIg (20% dei casi) che è correlata ad una sopravvivenza significativamente inferiore rispetto ai casi senza MIg, ma non è nota quale sia l'incidenza di crioglobuline e in particolare se di tipo I (18). Interessante sarebbe potere valutare la presenza di crioglobuline, in particolare di tipo I, nei soggetti con MGUS, di occasionale riscontro nella maggior parte dei casi, e asintomatica, ma che risulta essere presente nel 3,2% della popolazione oltre i 50 anni e 5,3% dei pazienti con più di 70 anni secondo uno studio della Mayo Clinic (22). Non emerge tuttavia quale sia la prevalenza della crioglobulinemia.

In sintesi non è chiaramente riportato in letteratura quale sia la reale incidenza delle crioglobuline tipo I nelle neoplasie ematologiche, né esistono inequivocabili indicazioni di ricerca di crioglobuline in questo tipo di pazienti. Dal punto di vista clinico è quindi necessario definire l'opportunità di richiedere la ricerca di crioproteine ed eventuale tipizzazione in soggetti con CM che presentano manifestazioni cutanee, neuropatie, artralgie, tipiche della crioglobulinemia, oppure richiederla solo a quei pazienti con CM e neoplasia ematologica anche se senza sintomi relati a crioglobulinemia, o ancora richiedere la ricerca delle crioglobuline a tutti i pazienti in cui si riscontri una CM.

Il decorso clinico, il trattamento e la prognosi della crioglobulinemia di tipo I dipendono dalla malattia di base che sottende alla crioglobulinemia (18).

Strategie terapeutiche

Non esistono farmaci di fondo per la sindrome crioglobulinemica. È necessario stratificare i pazienti in base alle loro caratteristiche cliniche ed alla gravità del loro quadro, inoltre per la complessità e la variabilità delle decisioni terapeutiche è estremamente importante un rapporto di stretta collaborazione e fiducia tra il medico ed il paziente. La prima terapia è quella della malattia di base, pertanto, se la crioglobulinemia è correlata all'infezione da HCV, è necessario intraprendere rapidamente un trattamento antivirale.

Per pazienti con malattia lieve caratterizzata dalla classica triade di astenia, saltuarie artralgie o artrite, episodi di porpora agli arti inferiori, il primo approccio terapeutico da intraprendere è una dieta a basso contenuto antigenico che può migliorare l'attività dei fagociti e modificare la composizione degli immunocomplessi. Durante il trattamento dietetico (circa 10 giorni consecutivi al mese) il paziente può mangiare esclusivamente riso, tacchino, coniglio, agnello, verdura e frutta fresca, condire con olio di oliva, bere acqua o tè. Un esempio di tale dieta si può scaricare dal sito www.alcri.it. I pazienti che seguono rigorosamente tale

dieta sperimentano una significativa riduzione dei sintomi entro 4-8 settimane. La dieta cronica ha un effetto di risparmio di steroidi, riduce la porpora e il dolore, non è costosa e non provoca effetti negativi; tuttavia, alcuni pazienti non riescono a seguire scrupolosamente la dieta poiché è difficile modificare le proprie abitudini alimentari (23).

In caso di artralgie è possibile utilizzare antiinfiammatori a cicli. Se i sintomi comunque tendono a persistere, si può inserire nel trattamento la colchicina, un alcaloide originariamente estratto dalle piante del genere *Colchicum*. Comunemente usata nelle fasi acute delle artropatie microcristalline in quanto in grado di inibire il metabolismo, la motilità e la chemiotassi dei polimorfonucleati e/o altre funzioni leucocitarie, è utilizzata nella nel trattamento della crioglobulinemia mista per le sue proprietà antiinfiammatorie e antiproliferative. In uno studio aperto, non controllato, la colchicina, alla dose di 1 mg/die, ha determinato miglioramenti clinici e laboratoristici, soprattutto nei primi 6-12 mesi di trattamento. È generalmente ben tollerata. Gli effetti collaterali più frequenti sono a carico dell'apparato gastroenterico e della crasi ematica. È considerata utile come trattamento per risparmiare steroidi.

Basse dosi di corticosteroidi (metilprednisolone 0,1-0,3 mg/kg) potrebbero essere impiegate per la terapia sintomatica della porpora e delle artralgie, ma devono essere tenuti presenti gli importanti effetti collaterali del trattamento e, nei pazienti HCV positivi, il rischio di aumento della viremia. Si scoraggia l'utilizzo dello steroide per i trattamenti cronici mentre tali dosaggi potrebbero essere considerati solo per controllare flares vasculitici in pazienti che non rispondono o che sono refrattari ad altri trattamenti. Se il trattamento steroideo è somministrato più a lungo dovrebbe essere attentamente monitorato (23).

Nelle manifestazioni moderato-severe di malattia quali l'insufficienza renale e/o sindrome nefritica o nefrosica, interstiziopatia polmonare, dolore addominale ricorrente severo, ulcere cutanee, neuropatia motoria progressiva, i farmaci immunosoppressori sono il cardine del trattamento.

I corticosteroidi come il prednisone e gli immunosoppressori soprattutto azatioprina e ciclofosfamide sono ampiamente utilizzati.

La plasmaferesi (PE) è stata confermata in uno studio di coorte retrospettivo su 159 pazienti con vasculite crioglobulinemica (CV) che frequentano 22 Centri italiani, quale procedura sicura nei pazienti con CV. La PE precoce dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti con CV grave, specialmente nei casi con imminente coinvolgimento renale, al fine di prevenire un danno renale irreversibile. Sebbene la sua efficacia nei pazienti con insufficienza multiorgano sia limitata, la PE è l'unico trattamento in grado di rimuovere rapidamente le crioglobuline circolanti e dovrebbe essere considerato un trattamento di emergenza (24).

Il farmaco biologico rituximab (RTX) è un'opzione di

trattamento comune per questa condizione soprattutto nei pazienti con ulcere cutanee, neuropatia periferica o glomerulonefrite e nei pazienti con CV persistente dopo PE. La monoterapia con RTX rappresenta un'ottima opzione per CV grave e può essere mantenuta a lungo termine nella maggior parte dei pazienti (25).

Ulteriori opzioni allo studio sono la combinazione RTX e belimumab che ha mostrato risultati promettenti nei pazienti refrattari con CV, mostrando una rapida risposta clinica.

Obinutuzumab è un nuovo anticorpo monoclonale umanizzato di tipo II anti-CD20 con capacità superiori di deplezione delle cellule B, mediate da una maggiore morte cellulare diretta tramite l'attivazione del complemento e la fagocitosi anticorpo-dipendente che ha documentato un salvataggio nella CV resistente al RTX in recente caso clinico (26).

L'uso combinato di ciclofosfamida e PE è stato considerato limitato e inconcludente.

La terapia con glucocorticoidi pulsati ad alte dosi può essere considerata il trattamento di prima linea delle forme gravi, generalmente in associazione con la PE (27).

Da considerare inoltre l'importanza di una corretta gestione locale dell'ulcera vasculitica che si basa su un'attenta valutazione delle caratteristiche della singola lesione: dimensione, profondità, condizioni del letto della ferita e presenza di granulazione, essudati, necrosi e/o infezioni. Pertanto, un accurato "debridement" rappresenta il passo più importante della gestione locale, con il supporto di farmaci attivi e nei casi più gravi di fattori di crescita e/o di innesto cutaneo. La gestione locale richiede l'uso di farmaci analgesici per controllare il dolore procedurale (28).

La terapia del dolore che si correla alla neuropatia sensitiva, può essere trattata con antidepressivi triciclici, gabapentin, pregabalin, anestetici locali o, in seconda linea, analgesici oppiacei.

Le strategie terapeutiche fin qui descritte sono riassunte nella Tabella 2.

I farmaci antivirali diretti introdotti in Italia a fine 2014 mostrano un'elevata efficacia (95-100%) nell'eradicazione del virus HCV. L'ultima generazione di questi farmaci è estremamente maneggevole ed efficace nella quasi totalità dei pazienti, compresi quelli anziani e con danno renale, il che li rende particolarmente utili nei soggetti con crioglobulinemia che possono avere una condizione renale già di attenzione per la patologia di

base.

Purtroppo, non sempre la risposta virale sostenuta si mantiene (permane un 10-15% di pazienti in cui si registra una recidiva), non sempre coincide con la scomparsa della crioglobulinemia che continua ad osservarsi in circa la metà dei pazienti, né corrisponde sempre alla remissione della sintomatologia. La porpora si può infatti osservare dal 3 al 15% dei soggetti trattati, la neuropatia dal 6 al 50%, il coinvolgimento renale dal 10 al 70% e le artralgie dallo 0 al 60%. Qualora i sintomi persistano occorre procedere con terapie immunosoppressive (29). Le motivazioni che sottendono al permanere della sintomatologia non sono ancora state chiarite, anche per la scarsità di dati ancora a disposizione: si rendono pertanto necessari ulteriori studi. Nel complesso, tuttavia, l'opzione della terapia contro HCV con gli antivirali diretti rappresenta una possibilità terapeutica estremamente importante, che può e deve essere tentata ogni volta che sia possibile.

CONCLUSIONI

I pazienti con crioproteine non trattate possono subire danni significativi ai tessuti fino all'amputazione degli arti o addirittura alla morte, pertanto l'importanza dell'analisi delle crioproteine non può essere sottovalutata. La crioproteinemia è infatti una condizione patologica la cui diagnosi non può prescindere dal riscontro laboratoristico. È tuttavia innegabile che la ricerca delle crioproteine risenta di numerose insidie che coinvolgono tutte le fasi del processo pre- post- e intranalitico. Queste criticità sono acuite dalla forte eterogeneità inter-laboratorio spesso condizionata dalle risorse tecnico-organizzative locali. Diviene quindi cruciale sollecitare la partecipazione dei laboratori ai programmi di VEQ per le crioproteine tenendo in considerazione che, attualmente, l'unico disponibile è quello proposto da UK-NEQAS.

Ancora poco diffusa è la ricerca del criofibrinogeno, la cui determinazione sarebbe complementare a quella delle crioglobuline anche per la sovrapposizione dei sintomi tra crioglobulinemia e criofibrinogenemia. Questo parametro, tuttavia, non inserito nei LEA, è poco o per niente richiesto dai clinici e conseguentemente raramente i laboratori si attrezzano per tale determinazione, dissuadendone così a loro volta la richiesta.

In sintesi, si avverte la necessità di avviare un processo di armonizzazione delle procedure analitiche

Tabella 2

Le strategie terapeutiche

- Se la sindrome crioglobulinemica è correlata all'HCV è necessario intraprendere rapidamente il trattamento antivirale.
- Nelle forme lievi può essere usata la dieta e la colchicina.
- Lo steroide è poco efficace.
- Nelle forme più severe trova indicazione il rituximab (RTX).
- Possono essere utili la plasmaferesi e altri farmaci citotossici per il trattamento delle forme gravi e della glomerulonefrite. Alcune condizioni, essenzialmente l'interessamento renale, quello nervoso severo, le riacutizzazioni generali gravi, vanno trattate intensivamente.
- Le ulcere severe necessitano di accurata valutazione e trattamento locale.
- Nelle forme resistenti al RTX sono in corso studi di combinazione RTX e belimumab oppure obinutuzumab

per la ricerca delle crioproteine che veda un continuo dialogo tra clinica e laboratorio con l'impegno in prima linea delle società scientifiche. In particolare, la strada intrapresa da SIBioC ed ALCRI è proprio quella di una collaborazione al fine di redigere raccomandazioni utili al laboratorista, al clinico e soprattutto al paziente.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Wintrobe M, Buell M. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma, with report of case in which extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis of retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1933;52:156-65.
2. Brouet J-C, Clauvel J-P, Danon F, et al. Biological and clinical significance of cryoglobulins. *Am J Med* 1974;57:775-88.
3. Kolopp-Sarda MN, Miossec P. Cryoglobulins: An update on detection, mechanisms and clinical contribution. *Autoimmun Rev* 2018;17:457-64.
4. Passerini G, Basile U. Ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline: Indicazioni per un protocollo condiviso. *Biochim Clin* 2010;34:218-22.
5. Napodano C, Gulli F, Ludovico G et al. Cryoglobulins: Identification, classification, and novel biomarkers of mysterious proteins. *Adv Clin Chem* 2021;104:299-340.
6. Michaud M, Pourrat J. Cryofibrinogenemia. *J Clin Rheumatol* 2013;19:142-8.
7. Debbia D, Campioli D, Turra F, et al. Le criticità della fase post-analitica della determinazione delle crioglobuline: risultati di uno studio pilota condotto in Emilia-Romagna. *Biochim Clin* 2021;45:388-94.
8. [https://www.immqas.org.uk/downloads/Cryoprotein_\(Pilot\)_2020.pdf](https://www.immqas.org.uk/downloads/Cryoprotein_(Pilot)_2020.pdf). www.immqas.org.uk. *Oncol Pilot Cryoprotein (image based)* (ultimo accesso: dicembre 2021).
9. Basile U, Gulli F, Gragnani L et al. IgG3 subclass: A possible trigger of mixed cryoglobulin cascade in hepatitis C virus chronic infection. *Dig Liver Dis* 2017;49:1233-39.
10. Gragnani L, Lorini S, Marri S, et al. Hematological and genetic markers in the rational approach to patients with hcv sustained virological response with or without persisting cryoglobulinemic vasculitis. *Hepatology* 2021;74:1164-73.
11. Pocino K, Napodano C, Gragnani L, et al. Solving the mystery of HBV-related mixed cryoglobulinemia: Potential biomarkers of disease progression. *Rheumatology (United Kingdom)* 2021;60:4418-27.
12. Dammacco F, Lauletta G, Russi S et al. Clinical practice: hepatitis C virus infection, cryoglobulinemia and cryoglobulinemic vasculitis. *Clin Exp Med* 2019;19:1-21.
13. Ferri C. Mixed cryoglobulinemia. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:1-17.
14. Terrier B, Marie I, Lacraz A, et al. Non HCV-related infectious cryoglobulinemia vasculitis: Results from the French nationwide CryoVas survey and systematic review of the literature. *J Autoimmun* 2015;65:74-81.
15. Moiseev S, Luqmani R, Novikov P et al. Cryofibrinogenaemia-A neglected disease. *Rheumatol (United Kingdom)* 2017;56:1445-51.
16. Loustaud-Ratti V, Riche A, Liozon E, et al. Prevalence and characteristics of Sjögren's syndrome or sicca syndrome in chronic hepatitis C virus infection: A prospective study. *J Rheumatol* 2001;28:2245-51.
17. Monaco S, Mariotto S, Ferrari S, et al. Hepatitis C virus-associated neurocognitive and neuropsychiatric disorders: Advances in 2015. *World J Gastroenterol* 2015;21:11974-83.
18. Sidana S, Rajkumar S, Dispenzieri A, et al. Clinical presentation and outcomes of patients with type 1 monoclonal cryoglobulinemia. *Am J Hematol* 2017;92:668-73.
19. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002;55:4-13.
20. Muchtar E, Magen H, Gertz MA. How I treat cryoglobulinemia. *Blood* 2017;129:289-98.
21. Pessach I, Dimopoulos MA, Kastiris E. Managing complications secondary to Waldenström's macroglobulinemia. *Expert Rev Hematol* 2021;14:621-32.
22. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2018;378:241-9.
23. Pietrogrande M, De Vita S, Zignego AL, et al. Recommendations for the management of mixed cryoglobulinemia syndrome in hepatitis C virus-infected patients. *Autoimmun Rev* 2011;10:444-54.
24. Marson P, Monti G, Montani F et al. Apheresis treatment of cryoglobulinemic vasculitis: A multicentre cohort study of 159 patients. *Transfus Apher Sci* 2018;57:639-45.
25. De Vita S, Quartuccio L, Isola M et al. A randomized controlled trial of rituximab for the treatment of severe cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 2012;64:843-53.
26. Genest DS, Pelletier K, Dallaire G et al. Obinutuzumab Rescue in Rituximab Resistant Mixed Cryoglobulinemia. *Kidney Int Rep* 2021;6:865-866.
27. Galli M, Monti G, Marson P et al. Recommendations for managing the manifestations of severe and life-threatening mixed cryoglobulinemia syndrome. *Autoimmun Rev* 2019;18:778-85.
28. Giuggioli D, Sebastiani M, Colaci M et al. Treatment of HCV-Related Mixed Cryoglobulinemia. *Curr Drug Targets* 2015;18:794-802.
29. Comarmond C, Cacoub P, Saadoun D. Treatment of chronic hepatitis C-associated cryoglobulinemia vasculitis at the era of direct-acting antivirals. *Ther Adv Gastroenterol* 2020;13:1-11.

How to report HbA_{1c} in presence of hemoglobin variants

Mariarosa Carta¹, Renata Paleari², Alessandro Terreni³, Andrea Mosca², on behalf of the Intersociety Study Group (SIBioC-SIPMeL) on Diabetes

¹Medicina di Laboratorio, ULSS 8 Berica, Vicenza (IT)

²Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano (IT)

³Centro regionale di riferimento per la Sicurezza e Qualità in Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze (IT)

ABSTRACT

Measurement of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) has a key-role in the management of diabetic patients. Clinicians need reliable and accurate measurements, with negligible pre-analytical and post-analytical errors. Among the pre-analytical variables, the presence of hemoglobin variants is a challenge to the laboratorians, both on pre-analytical and analytical phase. The purpose of this document is to give some practical advices on how to report HbA_{1c} values in presence of hemoglobin variants. This is an update of a previously reported document, published in 2011. The list of the most diffused method for measuring HbA_{1c} has been updated, and the most recent enzymatic assays have been included. A new aspect concerns the post-analytical phase, in which we recommend to report the presence of the hemoglobin variant in the final laboratory report.

Keywords: glycated hemoglobin, hemoglobin variants, post analytical phase

FOREWORD

In 2011 our study group has developed a document related to this issue (1), which needs to be updated and revised. This new version takes into account methods implemented since then, and promotes new recommendations and operative instructions.

BACKGROUND

Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) is a fundamental biomarker used in diagnosis and monitoring of diabetic patients. However, the presence of hemoglobin variants may interfere in the assay, thus producing unreliable or difficult to be interpreted results (2). Furthermore, the presence of a hemoglobin variant may cause a positive or a negative interference, either on the analytical phase or in the pre-analytical/biological phases.

The pre-analytical interference takes usually place when hemoglobin variants are present and not forming stable glucose adducts, or show abnormal glycation kinetics compared to HbA (such as Hb G Coughatta), or cause a reduction in red cell lifespan (such as Hb Zürich).

It is generally acknowledged that each interference due to a hemoglobin variant has to be evaluated experimentally, and for all the analytical methods used for HbA_{1c} measurement (3).

Regarding the worldwide diffusion, the most common hemoglobin variants are HbS, HbC, HbD and HbE. In subjects with homozygosis for HbS and for HbC (HbSS, HbCC) or with double heterozygosis (HbSC), HbA is absent, and consequently HbA_{1c} can't be produced, although a glycated component of the variant hemoglobin could be present. These subjects manifest a severe hemolytic anemia. Notably, since the HbA_{1c} production is related to the time of red cell exposure to glucose, it is advisable, under these circumstances, to monitor glycemic control by other methods such as, the various devices for the Continuous Glucose Monitoring (CGM) or by Flash glucose monitoring, or by other parameters not red cell related (glycated albumin, 1,5-anhydroglucitol).

Red cell lifespan, in the carriers of the above-mentioned hemoglobin variants, is generally regarded as normal. Some evidences, although not recent, suggest that red cell lifespan in HbC carriers, can be significantly reduced (4).

**Per una ampia fruibilità, di questo documento è disponibile la traduzione in Italiano quale materiale supplementare (1S).*

Questo documento intersocietario è pubblicato congiuntamente sulle riviste e/o i siti web delle Società che hanno concorso alla sua stesura.

Corresponding Author: Andrea Mosca, Dip. Fisiopatologia MCT Via Fratelli Cervi 93 20054 Segrate (IT), E-mail andrea.mosca@unimi.it

Received: 11.02.2022

Revised: 14.02.2022

Accepted: 14.02.2022

Published on-line: 25.02.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.008

HbA_{1c} can be therefore measured on these patients, providing that the hemoglobin variant does not interfere in HbA_{1c} assay. Table 1 reports the possible interference related to the most common hemoglobin variants, as seen in several methods for HbA_{1c}. This information has been obtained from the NGSP website (5), to which the reader is referred in order to recover an extensive bibliography on this topic.

The methods most frequently used for the determination of HbA_{1c} can be classified, based on analytical principles, in the following groups:

- Separative techniques, based on electrical charge difference (HPLC, capillary electrophoresis).

HbA_{1c} is separated from other hemoglobins according to the difference in the isoelectric points. All variants with an electrical charge different than HbA, could appear, in theory, in the chromatogram/electropherogram and become a possible interference. When using HPLC methods, the HbA_{1c} value is calculated, when no hemoglobin variants are present, by the following formula:

$$[\text{HbA}_{1c}] \% = [\text{HbA}_{1c}] / [\text{Hbtotal}] \times 100$$

If the hemoglobin variant (HbX) and its glucose adduct

(HbX_{1c}) elute or migrate separately from HbA and HbA_{1c}, their presence have no effect on the determination of HbA_{1c}, since most of the systems calculate HbA_{1c} according to the following equation:

$$[\text{HbA}_{1c}]_{\text{corrected}, \%} = [\text{HbA}_{1c}] / ([\text{HbA}] + [\text{HbA}_{1c}]) \times 100 \text{ (a)}$$

When, HbX and/or HbX_{1c} do not appear to be separated from HbA and HbA_{1c}, HbA_{1c} could be under- or over- estimated. HbC and HbS, are adequately separated by the most recent HPLCs (5). HbE and HbD, when present, can cause under- or over-estimation with the majority of HPLC methods (6).

- Immunochemical methods.

Various monoclonal antibodies, recognizing the 4-10 aminoacids of N-terminal β chain have been developed, and employed in several assays. Hemoglobin variants presenting mutations within these sequences (such as HbS and HbC) could produce an interference on HbA_{1c} measurement (5). However, the most recent II and III generation methods do not suffer from such interferences. Remarkably, the presence of variants with mutations outside the epitopes of these antibodies (such as HbE and HbD) do not cause problems in HbA_{1c} measurement (7).

Table 1

Effect of hemoglobin variants (HbS, HbC, HbD and HbE traits) on 16 most often used methods to measure HbA_{1c} (adapted, from ref. 5). More comprehensive information regarding HbA_{1c} assay interference is reported in a sub-table of the NGSP website.

Manufacturer	Analyzer (principle of the method)	Interference (Yes/No)			
		HbAS	HbAC	HbAD	HbAE
Abbott	Architect c (enzymatic)	No	No	No	No
Alere	Afinion (affinity chromatography)	No	No	No	No
Arkay	Adams Ha-8180V (HPLC)	No	No	Yes [§]	Yes [§]
Beckman	DxC 700 AU (immunochemistry)	No	No	No	No
Beckman	Synchron (immunochemistry)	No	No	No	No
Bio-Rad	D-10 (HPLC)	No	No	Yes [†]	Yes [†]
Bio-Rad	D-100 (HPLC)	No	No	No	No
Bio-Rad	Variant II turbo 2.0 (HPLC)	No	No	No	No
Ortho-Clinical	Vitros (immunochemistry)	No	No	No	No
Roche	Cobas c513 (immunochemistry)	No	No	No	No
Sebia	Capillarys 2FP (capillary electrophoresis)	No	No	No	No
Siemens	DCA Vantage (immunochemistry)	Yes [†]	No	No	Yes [†]
Siemens	Atletica (enzymatic)	No	No	No	No
Siemens	Dimension (immunochemistry)	No	No	No	No
Trinity - Menarini	Hb9210 premier (HPLC)	No	No	No	No
Tosoh	G8 versus 5.24, 5.28 (HPLC)	No	No	No	No

[†]interference causing a higher HbA_{1c} result (≥6% compared to the non-carrier, at the HbA_{1c} value of 42 mmol/mol);

[§]HbA_{1c} not quantified.

(^a)This correction is operative when hemoglobin variants in HPLC elute after HbA, but generally is not active if the hemoglobin variant is eluted before HbA. This formula is, as a matter of fact, always used in the capillary electrophoresis systems.

- Affinity chromatography.
These methods are based on the use of aminophenylboronic acid, which is a powerful binding molecule for glucose bound to human hemoglobin. A possible interference from fetal hemoglobin (HbF) could be present, if HbF % is above 10-15 % (5).
- Enzymatic methods.
Some proteolytic enzymes digest human hemoglobins, producing a mixture of peptides that can be oxidized by other ketoamino oxidases. The ketoamine bounds are oxidized by a Trinder reaction, resulting in color development which can be quantified by spectrophotometry.

Generally, the last three methods are considered "blind" to hemoglobin variants interference, in relation to the analytical phase. They provide just a numerical value, but the interference from hemoglobin variants has to be kept in mind as a possibility occurring either on the analytical or in the pre-analytical phase.

If the patient has a previous diagnosis of a hemoglobinopathy, it is mandatory to evaluate if such variant may or may not interfere with the HbA_{1c} method. Similarly, if the hemoglobin variant is responsible of a hemolytic anemia (such in the case of the unstable hemoglobins) the interpretation of the HbA_{1c} result has to be carefully evaluated, because of a possible reduction of red cell lifespan.

Generally, the presence, if any, of a hemoglobin variant is only occasionally detectable. It is worth to mention that several hemoglobin variants cannot be evidenced regardless of the principle of the method. Their presence could be only supposed after evaluation of other

parameters (such as blood cell count and related parameters). The use of high performing analytical methods allows the detection of hemoglobin variants. However, nowadays, the research and characterization of a hemoglobin variant is achieved by DNA analysis which guarantees a rapid and accurate approach.

RECOMMENDATIONS

- I. The users of separative assays to quantify HbA_{1c} should carefully inspect their chromatograms/electropherograms before issuing the final report. If an abnormal pattern is found, because of the presence of a possible hemoglobin variant, there are two possibilities:
 - i. the laboratory professional cannot perform additional investigations. In such a case, the HbA_{1c} result should not be reported. A comment suggesting further investigations is needed in the final report;
 - ii. the laboratory professional can perform additional investigations. Under these circumstances, the HbA_{1c} result can be reported, provided that the hemoglobin variant is identified as S, C, D or E in heterozygosis, and it can be well separated from HbA so that it does not affect the method (Table1).
- II. The users of any method need to remember that extreme HbA_{1c} values (such as either very low, or very high), should arise the possibility of assay interference. The same holds true if a marked discordance between HbA_{1c} and plasma glucose is found.

Table 2

Examples of comments to be added to the laboratory report in case of presence, in the heterozygous state, of a hemoglobin variant.

Hb variant	Comment
HbS	Patient with heterozygosis for HbS. The HbA _{1c} result has been corrected for the presence of HbS.
HbC	Patient with heterozygosis for HbC. The HbA _{1c} result has been corrected for the presence of HbC.
HbD	Patient with heterozygosis for HbD. The HbA _{1c} result has been corrected for the presence of HbD.
HbE	Patient with heterozygosis for HbE. A possible microcytic anemia is often associated to this condition. Even if the HbA _{1c} result has been corrected for the presence of HbE, the phenotypes could be very different, mostly in association with a β -thalassemia trait.
Unidentified Hb variant	HbA _{1c} not measurable due to the presence of an unknown hemoglobin variant. Other tests useful for the evaluation of the glycemic control are suggested, as well as further investigations in order to characterize the hemoglobin variant.

III. The presence of the hemoglobin variant should be reported in the final report. Some examples of additional comments are shown in Table 2.

IV. In all the cases where HbA_{1c} cannot be reported, it is advisable to use plasma glucose tests to monitor glucose control, avoiding hemoglobin-based tests (i.e. continuous glucose monitoring, flash glucose monitoring, glycated albumin).

ADDITIONAL CONSIDERATIONS

Some additional considerations may be added:

- The measurement of HbA_{1c} in subjects with homozygosis or double heterozygosis for a number of hemoglobin variants, as well as in subjects with double heterozygosis for a β hemoglobin variant in association with β -thalassemia, should not be ordered or performed.
- When an unknown hemoglobin variant is found, it is important to use a separative method with a system dedicated to the hemoglobinopathies.
- In several Italian Regions globin gene sequencing is routinely performed in at least one of the Italian National Health System Regional reference laboratories. Gene sequencing is not strictly necessary when clinical symptoms related to possible hemoglobin defects are absent. Further investigations by Next Generation Sequencing could be also considered, since this technique is somewhere also applied to the study of hemoglobin defects.

Finally, the interpretation of an HbA_{1c} result in a patient carrying a newly characterized hemoglobin variant, not belonging to those mentioned so far (S, C, D, E), has to be performed by specifically competent personnel, given the possible molecular interactions between the different hemoglobins present. For an in-depth study on this topic, the reader is referred to an excellent recent review (8).

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Dr. Giovanni Ivaldi (formerly Laboratorio di Genetica Medica, Ospedali Galliera, Genova) and Prof. Ferruccio Ceriotti (IRCCS Ca' Granda, Milano) for their critical revision of the document.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Carta M, Paleari R, Caldini A, et al. per il Gruppo di Studio Intersocietario SibioC-SIMeL Diabete Mellito. Refertazione dell'emoglobina glicata in presenza di varianti emoglobiniche. *Biochim Clin* 2011;35:42-5.
2. Bry L, Chem PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:153-63.
3. Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. *J*

- Diabetes *SciTechnol* 2009;3:446-51.
4. Prindle KH, McCurdy PR. Red cell lifespan in hemoglobin C disorders (with special reference to hemoglobin C trait). *Blood* 1970;36:14-9.
5. <http://www.ngsp.org/factors.asp> (last access: February 2022).
6. Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, et al. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 2005;51:776-8.
7. Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, et al. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb (HbA_{1c}) by 23 methods. *Clin Chem* 2008;54:1277-82.
8. Barberio G, Ivaldi G. Le emoglobinopatie in Italia. Parte II: prevenzione e diagnostica di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:96-107.

Glycated albumin stability in frozen plasma samples

Renata Paleari¹, Gabriele Santini², Andrea Mosca¹

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

²Werfen, R & D Department - Clinical Chemistry Strategic Business Unit, Milano, Italy

Keywords: *glycated albumin, glycemic control, pre-analytical phase*

Dear Editor,

glycated albumin (GA) has been proposed as a marker of glycemic control in a shorter time window compared to that of glycated hemoglobin (HbA_{1c}), reflecting the mean blood glucose concentration over the past 2–3 months (1). GA measurement may be useful for different clinical purposes (2). Since its levels undergo to more rapid and greater changes compared to HbA_{1c}, GA is particularly suitable in all those conditions requiring short-term glycemic control monitoring, such as the evaluation of poorly controlled diabetic patients or the early monitoring of the effectiveness of treatment after the beginning or modification of the therapy (3). Moreover, GA could be a valid alternative when the interpretation of HbA_{1c} is complex because of different patho-physiological conditions. Unlike HbA_{1c}, GA is not influenced by the lifespan of erythrocytes and it is not affected by the presence of hemolytic disorders, iron deficiency or hemoglobin variants (4). In diabetic patients undergoing hemodialysis and erythropoietin therapy, GA can better reflect glycemic control than HbA_{1c} and its use has been recommended by nephrology scientific societies (5). GA has also emerged as a useful indicator for assessing glycemic status during pregnancy and for monitoring neonatal diabetes (6). More recently, several evidences have shown that GA could also play a role in the risk assessment of macro-vascular complications (7).

Frequently, when longitudinal clinical studies are carried out, patient samples are stored in order to perform all the measurements in the same analytical run. To this end, it is very convenient to store plasma samples at -20 °C, since these freezers are very common in laboratories. Unfortunately, there are few evidences on the stability of GA in plasma samples stored at -20 °C. Watano T, et al. have evaluated the changes in GA levels in samples stored at -20 and -70 °C for 1, 3, 6 and 12 months (8), but no data are available for storage times shorter than two months, and it is not known whether the stability is related to the basal GA levels.

This letter reports about a study on the stability of GA in plasma samples stored at -20 °C for 72 days, following an isochronous design (9). The samples consisted of two plasma pools obtained from blood samples collected in EDTA for the measurement of HbA_{1c}. They were prepared by mixing plasma samples obtained from blood specimen with physiological (30 - 40 mmol/mol) or elevated (50 - 80 mmol/mol) HbA_{1c} values. One plasma aliquot from each pool was stored at -70 °C, to be used as reference sample. GA concentration was measured by the enzymatic method previously described (10), using the ILLab Taurus analyser (Werfen). All measurements were made in triplicate, in the same analytical session. The temperatures were constantly monitored by automatic detection system and ranged between -16 °C and -21 °C for the freezer at -20 °C (FD130BT, SAGI) and between -73 °C and -77 °C for the freezer at -70 °C (KLAB, KW).

The results obtained for the two plasma pools, at different time intervals, are reported in Figure 1. The GA values (in units %, upper part of the figure) are compared to the total albumin values (in g/L, lower part of the figure). GA concentration is shown to slightly increase during the storage of samples at -20 °C, with a relative increase of 2.5% in the low concentration pool and of 4.0% in the high concentration pool during 72 days of storage. The values of total albumin do not show relevant changes during storage. The obtained results are in agreement with those reported by Watano T, et al. who found a relative increase of +2.5% of the GA after three months of storage at -20 °C (8). In addition, our results show that the increase in GA concentration is quite similar in both low and high GA level pools.

Corresponding Author: Renata Paleari, Università degli Studi di Milano, Dip. Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Via Fratelli Cervi 93, 20054 Segrate (MI), E-mail renata.paleari@unimi.it

Ricevuto: 26.11.21

Revisionato: 17.12.21

Accettato: 10.01.2022

Publicato on-line: 25.01.22

DOI: 10.19186/BC_2022.003

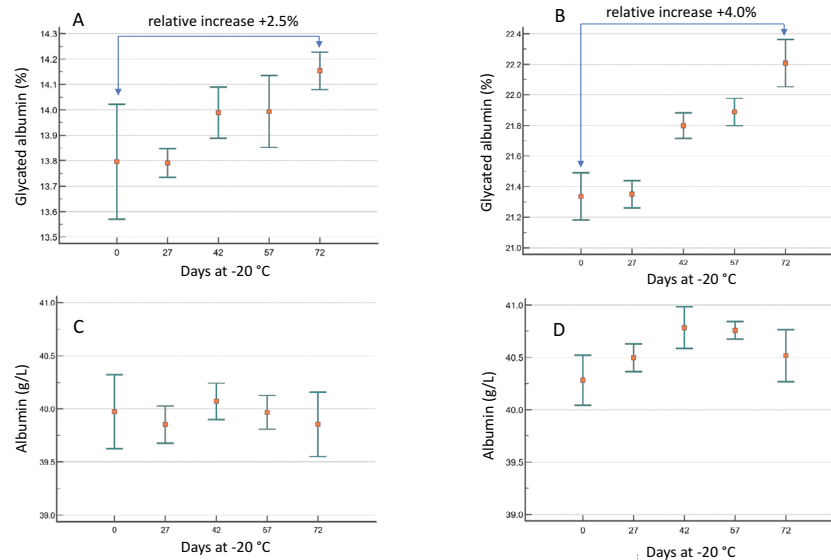


Figure 1

Progressive changes of Glycated Albumin (GA) (panels A and B) and Total Albumin levels (panels C and D) in low (panels A and C) and high (panels B and D) GA plasma pools, during storage at -20 °C. Mean values (square symbols) and $\pm 1SD$ range (bars), are reported. The percentage of the relative increase of GA in both pools, compared to the basal level, are indicated. The changes in total albumin are not remarkable.

For a careful interpretation of the results, the differences in GA values found after 72 days at -20 °C were compared with the critical difference for GA measurement that we had previously assessed from a study of the biological variability and that was found to be 7.5% (11). The changes in GA values during storage of plasma samples resulted to be well below the critical difference value, so it is possible to conclude that storage at -20 °C for up to two months does not alter significantly the GA values.

The causes that would lead to an increase in GA concentration during storage at -20 °C remain to be investigated. Some authors have speculated that the glycation reaction may slowly progress during the storage at -20 °C. Another possible explanation could be a progressive denaturation of albumin, resulting in exposure of some internal Lysine residues that could bind glucose. Further investigations are needed to clarify these aspects.

CONFLICT OF INTERESTS

None.

REFERENCES

1. Zendjabil M. Glycated albumin. *Clin Chim Acta* 2020;502:240-4.
2. Koga M. Glycated albumin; clinical usefulness. *Clin Chim Acta* 2014;433:96-104.
3. Koga M, Saito H, Kasayama S. Patients who showed paradoxical increase in HbA_{1c} levels after intensification of diabetes treatment. *Clin Biochem* 2015;48:459-62.
4. Koga M, Hashimoto K, Murai J, et al. Usefulness of glycated albumin as an indicator of glycemic control status in patients with hemolytic anemia. *Clin Chim Acta* 2011;412:253-7.
5. Nakao T, Inaba M, Abe M, et al. Best practice for diabetic patients on hemodialysis 2012. *Ther Apher Dial* 2015;19:40-66.
6. Hashimoto K, Osugi T, Noguchi S et al. A1C but not serum glycated albumin is elevated because of iron deficiency in late pregnancy in diabetic women. *Diabetes Care* 2010;33:509-11.
7. Lee SH, Kim Y, Park SY, et al. Pre-stroke glycemic variability estimated by glycated albumin is associated with early neurological deterioration and poor functional outcome in prediabetic patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovascular Diseases* 2021;50:26-33.
8. Watano T, Sasaki K, Omoto K, et al. Stability of stored samples for assay of glycated albumin. *Diab Res and Clin Practice* 2013;101:e1-e2.
9. Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fres J Anal Chem* 1998;360:359-61.
10. Paroni R, Ceriotti F, Galanello R, et al. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. *Clin Biochem* 2007; 40:1398-405.
11. Montagnana M, Paleari R, Danese E, et al. Evaluation of biological variation of glycated albumin (GA) and fructosamine in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2013;423:1-4.



BIO MEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.