



BANDO FONDAZIONE LICE 2022 PROGETTO di RICERCA

Responsabile del Progetto: Laura Licchetta

Data di nascita: 13/02/1981

Affiliazione: IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, programma Epilessia

Ente ospitante il Responsabile del Progetto: IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - Ospedale Bellaria - Via Altura, 3 - 40139 Bologna (BO) Italia

Centri partecipanti

Unità 1: IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna – Programma Epilessia

Unità 2: IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna – Programma Neurofarmacologia Clinica

Titolo del progetto: MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEI FARMACI ANTICRISI ATTRAVERSO DISPOSITIVI DI MICRO-CAMPIONAMENTO CAPILLARE: BASTA UN PRICK!

Sinossi

Il monitoraggio terapeutico (TDM) dei farmaci anticrisi (ASMs) è uno strumento fondamentale nel follow-up dei pazienti con epilessia, finalizzato all'ottimizzazione della terapia farmacologica individuale e alla sorveglianza degli eventi avversi.

Lo standard di riferimento per il campionamento, il prelievo venoso, richiede personale esperto e può risultare di difficile esecuzione in pazienti pediatrici o scarsamente collaboranti.

Applicazioni innovative per il TDM sono basate sul micro-campionamento capillare tramite puntura da dito (*prick*). Rispetto al prelievo venoso, queste tecniche, prevedono volumi ridotti quindi un prelievo mini-invasivo e la semplificazione del processo di raccolta dei campioni anche a distanza, con possibilità di invio al laboratorio di riferimento. La stabilità degli analiti (ASMs da analizzare) nel sangue essiccato consente di evitare lo stoccaggio a temperature refrigerate.

Uno dei dispositivi di micro-campionamento, conosciuto in commercio come Mitra™, si basa sulla tecnica "*volumetric absorptive microsampling*" (VAMS). Questo dispositivo, già validato per la quantificazione di ASMs, si è rivelato affidabile rispetto al prelievo standard in ambiente ospedaliero. Tuttavia, spesso richiede l'intervento o supervisione da parte di un operatore per la raccolta di un'aliquota sufficiente, il tempo di conservazione pre-analitica è limitato e non ci sono dati in letteratura di esperienza in *real-world*.

Un dispositivo alternativo è il qDBS, basato sulla tecnica del "*dried blood spot*" (DBS). Rispetto agli altri dispositivi, offre il vantaggio di assicurare il prelievo di un'aliquota adeguata, mediante un rivelatore colorato che fornisce un'immediata conferma del volume prelevato. Viene inoltre proposto senza necessità di training nell'utilizzo.

Obiettivi:

1. Verifica di affidabilità e fattibilità del micro-campionamento VAMS attraverso il dispositivo Mitra™ a domicilio;
2. Validazione tecnica della misurazione di ASMs attraverso il dispositivo qDBS;
3. Cross-validation della tecnica di misurazione di ASMs tramite qDBS, Mitra™ e standard di riferimento.

Breve descrizione del piano sperimentale

Reclutamento di 100 pazienti afferenti al Centro Epilessia ed esecuzione di: 1 prelievo di sangue venoso, 1 prelievo attraverso Mitra™ e 1 attraverso qDBS.

1. A ciascun paziente sarà inoltre consegnato un kit contenente un dispositivo Mitra™ e una nota operativa "*user friendly*" per il micro-campionamento a domicilio. Il mattino successivo il paziente procederà al prelievo e invio in laboratorio autonomamente.

I campioni saranno analizzati presso il Laboratorio di Neurofarmacologia Clinica attraverso cromatografia liquida ad alta prestazione combinata a spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS). I risultati ottenuti, in termini di concentrazione di ASMs, saranno comparati tra le due metodiche di prelievo (Mitra™ a domicilio *versus* Mitra™ in ospedale). La fattibilità del prelievo Mitra™ a domicilio sarà valutata anche attraverso apposito questionario (obiettivo 1).

2. Valutazione di *recovery*, effetto matrice, accuratezza e precisione del metodo di estrazione di ASMs da qDBS; valutazione della stabilità degli stessi nella matrice in tempi diversi e a diverse temperature, secondo le linee guida EMA (obiettivo 2).
3. Confronto delle concentrazioni di ASMs rilevate attraverso qDBS *versus* standard di riferimento e *versus* Mitra™ (obiettivo 3).

Risultati attesi

Lo studio permetterà di valutare se, con l'aiuto della nota operativa "*user friendly*", il dispositivo Mitra™, già testato in ambiente

ospedaliero, si dimostri affidabile e fattibile nel suo utilizzo "at home".

Ci aspettiamo che il dispositivo qDBS si riveli affidabile rispetto allo standard di riferimento per la quantificazione di ASMs, garantendo un micro-campionamento preciso eseguito in totale autonomia. La maggiore stabilità e durata di conservazione pre-analitica del campione potrebbe garantire una maggiore applicabilità di qDBS rispetto al Mitra™.

Il progetto sarà co-finanziato da IRCCS-Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, coinvolto in un progetto sulla Telemedicina (GR-2018-12365475). La combinazione tra Telemedicina e l'applicazione di questi dispositivi permetterà un'adeguata gestione dei pazienti a distanza, riducendo le difficoltà relate al prelievo e i costi per il paziente.

Parole chiave:

Monitoraggio terapeutico (*Therapeutic drug monitoring* -TDM)

Farmaci anticrisi (*Antiseizure medications* - ASMs)

Micro-campionamento capillare

Volumetric absorptive microsampling (VAMS)

Dried blood spot (DBS)

Razionale

L'epilessia è un disturbo cronico che ha una prevalenza di 6,38 casi per 1000 e un'incidenza di 67,77 casi per 100.000 [1].

L'epilessia comporta costi significativi [2] ed è classificata dall'OMS come la seconda patologia neurologica più gravosa nello studio *Global Burden of Disease* del 2010 [3].

Il trattamento farmacologico è solo sintomatico e può comportare effetti collaterali anche gravi. Sia i farmaci anticrisi (*antiseizure medications*, ASMs) di vecchia che di nuova generazione sono associati a reazioni avverse (*Adverse Drug Reactions*, ADRs) eterogenee, che includono neurotossicità, reazioni di ipersensibilità, tossicità ematica, epatica e pancreatica. Possono inoltre verificarsi interazioni farmacocinetiche/farmacodinamiche con altri ASMs e/o con altri farmaci ampiamente utilizzati, quali antibiotici e anticoagulanti orali [4, 5]. Identificare la terapia adatta per il singolo paziente può richiedere diversi tentativi farmacologici. Inoltre circa il 30% dei pazienti ha un'epilessia farmacoresistente [6] e necessita di un carico maggiore di ASMs con aumentato rischio di effetti avversi (*Adverse Effects*, AEs) che determinano peggioramento della qualità di vita [7], compromettono la *compliance* e costituiscono un ostacolo al raggiungimento di dosi ottimali di ASMs per il controllo delle crisi [8]. Pertanto, i pazienti con epilessia necessitano di assistenza regolare e continuativa, per la sorveglianza delle ADRs e gli aggiustamenti terapeutici sulla base del dosaggio dei livelli plasmatici di ASMs.

Il monitoraggio terapeutico dei farmaci (*Therapeutic drug monitoring*, TDM) è definito come la misura e l'utilizzo clinico delle concentrazioni di un farmaco in un fluido biologico (siero/plasma) per aggiustare il dosaggio e il programma terapeutico, in base alle esigenze individuali di ciascun paziente [9].

Il TDM di ASMs è uno strumento fondamentale nel follow-up dei pazienti con epilessia, finalizzato all'ottimizzazione della terapia individuale e alla sorveglianza delle possibili ADRs [10, 11]. Gli ASMs si prestano particolarmente all'utilizzo del TDM per (i) l'elevata variabilità della cinetica interindividuale (o per la cinetica non lineare che rende difficile la previsione della concentrazione plasmatica solo sulla base della dose orale, es. fenitoina), (ii) l'alto potenziale d'interazioni farmacologiche e, per alcuni ASMs (iii) il basso indice terapeutico, ovvero ristretto margine di sicurezza tra concentrazioni efficaci e concentrazioni tossiche. In epilessia, il TDM trova molteplici indicazioni: oltre all'identificazione della concentrazione terapeutica individuale ottimale, è utile in corso di terapia cronica (i) per valutare le possibili interazioni farmacologiche, aderenza alla terapia; (ii) in caso di AEs/tossicità, cambio di formulazione; (iii) in popolazioni speciali di pazienti (pediatriche, donne in stato di gravidanza, anziani e individui con insufficienza epatica o renale) soggetti a significative variazioni fisiologiche o patologiche che determinano variazioni delle caratteristiche farmacocinetiche di ASMs [9].

Affinché il TDM possa essere clinicamente utile, la misurazione deve avvenire in condizione di terapia stabile (*steady-state*), alla concentrazione minima giornaliera. Questo richiede un prelievo ematico da eseguirsi in ambiente medico al mattino prima dell'assunzione della terapia, che avviene ad orari regolari, spesso non procrastinabili, comportando un ulteriore carico soprattutto per pazienti con crisi refrattarie che necessitano di fare lunghi viaggi per raggiungere centri specialistici di terzo livello. Nel TDM, lo standard di riferimento per il campionamento è il prelievo venoso, ma richiede personale infermieristico esperto e può risultare di difficile esecuzione in pazienti pediatriche o scarsamente collaboranti.

Applicazioni innovative per il TDM sono basate sul micro-campionamento capillare tramite puntura da dito (*prick*). Rispetto al prelievo ematico tradizionale, queste tecniche prevedono volumi ridotti quindi un prelievo mini-invasivo e la semplificazione del processo di raccolta dei campioni. La stabilità degli analiti (ovvero i ASMs da analizzare) nel sangue essiccato, consente di evitare lo stoccaggio a temperature refrigerate. Una tecnica relativamente recente di micro-campionamento, il "*Volumetric Absorptive Microsampling*" (VAMS), è usata per ottenere campioni essiccati di sangue o altre matrici biologiche per analisi quantitative. La tecnica VAMS apporta vantaggi significativi in termini di volume di campionamento, semplificando la raccolta del campione [12]. Uno dei più recenti dispositivi che si basa sulla tecnologia VAMS è conosciuto in commercio come Mitra™ (Neoteryx, California). Questo dispositivo, già validato in letteratura per la quantificazione di alcuni ASMs [13], è stato nuovamente validato e poi testato c/o il nostro Istituto, rivelandosi affidabile rispetto al prelievo standard. Nello specifico, nell'ambito di un progetto di ricerca sulla Telemedicina (TELE-EPIC, GR-2018-12365475) [14] è stato condotto uno studio di *cross-validation* c/o il Laboratorio di Neurofarmacologia Clinica dell'IRCCS-Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna. Nel periodo luglio 2021-aprile 2022 sono stati arruolati 300 pazienti (di cui 141 in politerapia), sottoposti a prelievo venoso standard e prelievo capillare tramite dispositivo Mitra™ per la quantificazione di 13 ASMs (acido valproico, carbamazepina, etosuccimide, fenitoina, fenobarbital, lacosamide, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, perampanel, rufinamide, topiramato, zonisamide) attraverso cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa tandem (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*, UHPLC-MS/MS). I dati preliminari evidenziano una buona correlazione tra i valori delle concentrazioni ematiche di ASMs ottenuti attraverso Mitra™ e le relative concentrazioni plasmatiche ottenute da prelievo di sangue venoso (standard di riferimento). Tuttavia, l'utilizzo di Mitra™ spesso richiede l'intervento o supervisione da parte di un operatore per la raccolta di un'aliquota sufficiente, il tempo di conservazione pre-analitica è limitato e non ci sono dati in letteratura sull'utilizzo *at-home*.

Un secondo dispositivo alternativo di micro-campionamento è il qDBS (Capitainer, Svezia) che si basa sulla tecnica del *dried blood spot* (DBS), ossia il prelievo, su una apposita carta da filtro, di una goccia di sangue da polpastrello che viene lasciata asciugare e analizzata per la quantificazione delle concentrazioni di ASMs [15]. A differenza dei DBS finora riportati in letteratura, questo dispositivo offre il vantaggio di un segnale immediato della corretta aliquotazione attraverso il cambio di colore della cartina imbevuta di sangue. Questo permette di verificare la corretta aliquotazione ed evitare dunque fenomeni di *over* o *underfilling*, che potrebbero compromettere l'analisi stessa. Si tratta di un metodo accurato e preciso, senza necessità di *training* [16]. Tuttavia, al contrario del Mitra™, il dispositivo qDBS non è stato ancora validato e non ci sono dati in letteratura sulla potenziale applicazione per la quantificazione dei ASMs.

Per la validazione e l'utilizzo bioanalitico, queste tecniche devono dimostrare l'affidabilità rispetto allo standard di riferimento.

Obiettivi

L'obiettivo principale dello studio è l'applicazione di nuovi dispositivi di micro-campionamento ematico basati su tecnica VAMS e DBS per la quantificazione delle concentrazioni dei ASMs.

Obiettivo 1. Verifica di affidabilità e fattibilità del micro-campionamento VAMS attraverso il dispositivo Mitra™ eseguito in autonomia dal paziente a domicilio (task 1.1 e 1.2).

In particolare, l'obiettivo è di verificare che Mitra™ sia uno strumento idoneo per il campionamento anche a domicilio, che consenta ai pazienti di prelevare in modo autonomo un'aliquota di sangue con minime istruzioni e di inviarla correttamente e in tempi adeguati al laboratorio di riferimento per l'analisi.

Obiettivo 2. Validazione tecnica del metodo di estrazione di ASMs da dispositivo qDBS e quantificazione attraverso UHPLC-MS/MS.

Scopo della validazione è quello di dimostrare l'affidabilità del metodo nella determinazione della concentrazione degli analiti in una matrice biologica specifica (ovvero sangue essiccato) in termini di *recovery*, precisione e accuratezza.

Dopo una fase di messa a punto del metodo di estrazione di una selezione di ASMs (task 2.1), si procederà con la verifica della stabilità degli stessi nella matrice (task 2.2). Questa è una fase importante della validazione perché permette di stabilire il tempo massimo di conservazione del campione prima dell'analisi per garantire un valore di concentrazione preciso e accurato.

Obiettivo 3. *Cross-validation* della tecnica di misurazione di ASMs tramite dispositivo qDBS e standard di riferimento (task 3.1) e tramite dispositivo qDBS e Mitra™ (task 3.2).

Piano Sperimentale

Obiettivo 1. Affidabilità e fattibilità del dispositivo Mitra™ a domicilio.

Task.1.1: Verifica dell'affidabilità del micro-campionamento attraverso dispositivo Mitra™ a domicilio attraverso il confronto delle concentrazioni di ASMs rilevate da dispositivo Mitra™ a domicilio con quelle ottenute dallo stesso dispositivo in ambiente ospedaliero.

Si prevede l'arruolamento di 100 pazienti, che dopo breve training da parte di personale infermieristico specializzato, saranno invitati ad eseguire in autonomia un prelievo capillare mediante Mitra™. A tutti i pazienti sarà inoltre consegnato un kit per il campionamento con Mitra™ a domicilio, accompagnato da una nota operativa "*user friendly*" e da indicazioni per la spedizione del campione in laboratorio.

Il paziente, il mattino successivo all'arruolamento, prima dell'assunzione della terapia procederà autonomamente al prelievo a domicilio, e al successivo invio in laboratorio nella stessa giornata.

Entrambi i prelievi - quello eseguito attraverso il dispositivo Mitra™ in ospedale e quello eseguito a domicilio - saranno analizzati presso il Laboratorio di Neurofarmacologia Clinica mediante UHPLC-MS/MS, attraverso un metodo già validato durante lo studio TELE-EPIC [13, 14]. I risultati ottenuti, in termini di concentrazione di ASMs, saranno comparati tra i due prelievi.

Sulla base dei dati raccolti nell'ambito del progetto TELE-EPIC, l'analisi verrà eseguita su ASMs selezionati, ovvero quelli più largamente utilizzati nella pratica clinica: acido valproico, carbamazepina, lacosamide, lamotrigina e levetiracetam.

Task.1.2: Verifica della fattibilità del micro-campionamento a domicilio e successivo invio in laboratorio per l'analisi, attraverso misurazione di percentuale di successo della procedura.

La fattibilità dell'utilizzo del dispositivo Mitra™ a domicilio, verrà misurata attraverso:

- numero di campioni pervenuti in laboratorio per l'analisi;
- intervallo di tempo tra prelievo e arrivo in laboratorio (considerando un tempo massimo di conservazione pre-analisi del dispositivo Mitra™ di 7 giorni) [13];
- adeguatezza dei campioni e numero di prelievi correttamente aliquotati sul totale.

Eventuali difficoltà riscontrate dai pazienti nell'utilizzo in autonomia del dispositivo o difficoltà logistiche legate alla spedizione del campione saranno riportate in un apposito questionario elettronico.

Obiettivo 2.

Validazione tecnica del metodo di quantificazione attraverso qDBS.

Task.2.1: Messa a punto del metodo di estrazione di una selezione di ASMs da dispositivo qDBS e validazione secondo le linee guida EMA [17].

La validazione del metodo prevede:

- prelievo di sangue venoso di 10 individui che non assumono ASMs (definito come bianco);
- aggiunta al campione di una quantità nota di farmaco;
- aliquota di volume fisso (10 µl) di sangue contenente il farmaco e trasferimento sul dispositivo in esame (qDBS);
- estrazione dell'analita (ASM) da dispositivo per la verifica della concentrazione.

Questa procedura viene eseguita in triplicato.

Task.2.2: Verifica della stabilità degli analiti nella matrice e determinazione della durata di conservazione pre-analisi del

campione. Per questa task, verranno analizzati dei bianchi dopo diversi giorni dal campionamento e a diverse temperature. Si procederà quindi al confronto dei valori di concentrazioni di ASMs, estratte in tempi diversi e dopo conservazione a diverse temperature.

Obiettivo 3.

Cross-validation di qDBS, Mitra™ e standard di riferimento.

Si prevede l'arruolamento degli stessi 100 pazienti coinvolti nell'obiettivo 1 del presente progetto.

Ai pazienti sarà prelevato un campione di sangue venoso. Dopo breve *training* da parte del personale infermieristico, ai pazienti sarà chiesto di eseguire un prelievo attraverso un dispositivo Mitra™ e qDBS.

I campioni (sangue venoso, qDBS e Mitra™) verranno analizzati con il medesimo metodo attraverso UHPLC-MS/MS.

Task.3.1: Confronto delle concentrazioni di ASMs rilevate dopo prelievo attraverso dispositivo qDBS *versus* quelle ottenute dopo prelievo venoso (standard di riferimento).

Task.3.2: Si eseguirà il confronto delle concentrazioni di ASMs rilevate dopo prelievo attraverso dispositivo qDBS *versus* i valori di concentrazioni ottenute da micro-campionamento attraverso dispositivo Mitra™.

Metodi

Disegno dello studio: studio di *cross-validation* tra 2 metodiche, previa validazione di metodo estrattivo da dispositivo qDBS.

Popolazione e setting: in base alla precedente esperienza (studio TELE-EPIC) stimiamo di arruolare un numero di 80-120 pazienti (media: 100 pazienti) in un periodo di 6 mesi.

Saranno reclutati pazienti adulti afferenti al Centro Epilessia - IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, in terapia con i seguenti ASMs: acido valproico, carbamazepina, lacosamide, lamotrigina e levetiracetam.

Periodo di arruolamento: 6 mesi

Procedure e interventi:

1. Arruolamento: al momento dell'arruolamento, previa apposita spiegazione dello studio e firma del consenso informato verrà eseguito:

- 1 prelievo di sangue venoso (5 mL) raccolto in provette contenenti anticoagulante (litio eparina);
- 1 prelievo capillare attraverso Mitra™;
- 1 prelievo capillare attraverso qDBS.

I campioni saranno raccolti al mattino nella fascia oraria 8:00-10:00 *am*, prima dell'assunzione della terapia. Tutti i campioni saranno accompagnati da un modulo apposito in cui vengono specificati, oltre ai dati anagrafici del paziente, ASMs assunti e relative dosi, eventuali co-terapie, ora del prelievo, orario dell'ultima assunzione (avvenuto la sera precedente).

Il prelievo contemporaneo dei 3 campioni (sangue venoso, con Mitra™ e tramite qDBS) in ambiente ospedaliero permetterà di eseguire il campionamento per lo studio di *cross-validation* (obiettivo 3) in condizioni standardizzate, eliminando eventuali fattori confondenti e variabili che determinano una differenza fisiologica nelle concentrazioni plasmatiche dei farmaci (es. differenza nell'orario dell'assunzione della terapia, diverse condizioni di assorbimento del farmaco, etc).

2. At home: agli stessi pazienti sarà poi consegnato un kit per il campionamento a domicilio. Il kit conterrà:

- 1 dispositivo Mitra™ (+ 1 di riserva);
Si tratta di un dispositivo monouso facile da maneggiare, dotato di una punta assorbente (*tip*) attraverso cui il sangue capillare viene raccolto dopo una puntura da polpastrello; dopo il prelievo, il dispositivo viene inserito nell'apposito involucro (*clamshell*) per garantire la protezione del campione di sangue essiccato.
- una nota operativa "*user friendly*" preparata ad hoc per lo studio;
La nota operativa conterrà un link per visualizzare un video tutorial (https://www.youtube.com/watch?v=8KkaS-8LSBs&ab_channel=Neoteryx) ed un elenco di operazioni da eseguire redatte con un linguaggio chiaro e conciso, adeguato alla popolazione in esame.
- le indicazioni necessarie per procedere all'invio del campione in laboratorio.

Il paziente, il mattino successivo all'arruolamento, prima dell'assunzione della terapia procederà autonomamente al prelievo attraverso Mitra™ a domicilio, e all'invio in laboratorio nella stessa giornata.

Prevediamo il coinvolgimento di una azienda attiva nel settore trasporto e servizi di logistica al fine di ottenere una copertura sul territorio nazionale e offrire un servizio adeguato ai pazienti afferenti al progetto.

3. Laboratorio

I campioni di sangue venoso vengono centrifugati a 1700 g per 10 min a 4°C e conservati a -20°C.

I campioni raccolti tramite VAMS sono lasciati ad asciugare a temperatura ambiente (21°C-25°C) per almeno 2 ore e conservati prima dell'analisi in un sacchetto contenente silice gel in bustine.

Si procederà alla quantificazione delle concentrazioni di ASMs nei 3 campioni attraverso UHPLC-MS/MS.

La differenza tra i due valori medi di concentrazione ottenuti dovrebbe essere compresa in $\pm 20\%$ per almeno il 67% delle ripetizioni, secondo le linee guida EMA [17].

I metodi di quantificazione di ASMs nel plasma e nel dispositivo Mitra™ che prevedono l'utilizzo di un kit commerciale sono stati precedentemente validati [13] e riadattati nel Laboratorio di Neurofarmacologia Clinica nell'ambito del progetto TELE-EPIC [14]. Queste metodiche da utilizzare per gli obiettivi 1 (**Task.1.1 - Task.1.2**) e 3 (**Task.3.1 - Task.3.2**) prevedono una prima fase di reidratazione del *tip* e l'estrazione degli analiti in solvente organico seguita dall'analisi in UHPLC-MS/MS in modalità MRM (*multiple reactions monitoring*).

Per l'obiettivo 2 sarà necessaria una fase preliminare di studio del dispositivo mediante l'utilizzo di diversi solventi e diverse condizioni al fine di trovare quella ottimale per l'estrazione degli analiti dalla matrice. Determinate le condizioni ottimali di trattamento pre-analitico del campione, le analisi saranno eseguite in UHPLC-MS/MS in modalità MRM.

Il metodo verrà convalidato in conformità con le linee guida dell'EMA determinando *recovery*, linearità della curva di calibrazione, accuratezza, precisione e riproducibilità inter-analisi tra diversi operatori (**Task.2.1**). La stabilità degli analiti della matrice verrà verificata testando il dispositivo a diverse temperature di stoccaggio (temperatura ambiente, -20°C come da linea guida) [17] per diversi tempi di conservazione (7, 15, 30 giorni) (**Task.2.2**).

Analisi statistica: la correlazione delle concentrazioni ottenute sarà eseguita attraverso il test di Bland-Altman plot. I risultati saranno presentati come media e relativi Intervalli di Confidenza al 95% (IC 95%).

Risultati attesi e rilevanza clinica

Il TDM costituisce un valido supporto alla terapia farmacologica delle epilessie, finalizzato all'individuazione della concentrazione terapeutica ottimale per ciascun paziente e al contempo minimizzando gli effetti avversi.

L'applicazione di tecniche di ultima generazione e l'utilizzo di dispositivi mini-invasivi di prelievo capillare per l'analisi quantitativa di ASMs, semplificherà la raccolta del campione, bypassando i limiti legati al prelievo di sangue venoso. Anche per i pazienti in età pediatrica o non collaboranti (es. pazienti con disabilità intellettiva e disturbi comportamentali), in cui il dosaggio dei ASMs è spesso demandato per difficoltà tecniche, potrà essere garantita una razionalizzazione della terapia farmacologica sulla base della quantificazione dei ASMs grazie ad un prelievo non invasivo eseguito dal *caregiver*.

Obiettivo 1

Ci attendiamo che il dispositivo di micro-campionamento VAMS -Mitra™, già testato in ambiente ambulatoriale sperimentale, si riveli affidabile anche nel suo utilizzo a domicilio, garantendo un'aliquota adeguata per la quantificazione di ASMs con l'aiuto della nota operativa "*user friendly*" e la spiegazione da parte dell'operatore. Questo permetterà la raccolta di campioni al di fuori del contesto ospedaliero e consentirà ai pazienti di prelevare in autonomia un adeguato campione ematico, ovunque essi si trovino e mediante l'uso di poche istruzioni. Lo studio consentirà inoltre di verificare la fattibilità e di evidenziare possibili problematiche logistiche nell'utilizzo di questi dispositivi "*at home*".

Obiettivo 2-3

Ci aspettiamo inoltre, che il dispositivo qDBS si dimostri affidabile e comparabile allo standard di riferimento per il dosaggio di ASMs, garantendo un micro-campionamento adeguato eseguito dal paziente o dal *caregiver*, senza intervento di personale qualificato. Grazie alla presenza di un rivelatore colorato che fornisce un'immediata conferma visiva del corretto campionamento, qDBS è in grado di assicurare il prelievo di un'aliquota adeguata in totale autonomia. Oltre alla maggiore maneggevolezza per il paziente, il qDBS potrebbe garantire una migliore applicabilità rispetto al Mitra™. In particolare, la maggiore stabilità degli analiti nella matrice e la più lunga conservazione pre-analitica del campione potrebbero bypassare eventuali problematiche relate ai tempi di invio del campione in laboratorio per l'analisi.

Questo dispositivo inoltre, rispetta l'impegno internazionale degli obiettivi di sviluppo sostenibile dell'agenda 2030 dell'ONU grazie alla sua composizione in carta totalmente degradabile.

L'utilizzo di queste metodiche nel complesso ridurrà la necessità di accesso in ambiente ospedaliero e potrebbe essere particolarmente utile per quei pazienti che vivono in località lontano da ospedali specializzati che offrono servizi TDM.

Il progetto sarà co-finanziato da IRCCS-Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, coinvolto in un progetto sulla Telemedicina (GR-2018-12365475). La combinazione tra Telemedicina e l'applicazione di questi dispositivi di micro-campionamento garantirà un'adeguata gestione a distanza dei pazienti con epilessia, riducendo al contempo le difficoltà relate al prelievo venoso e i costi per il paziente e il SSN.

Bibliografia

1. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 2017;88:296–303. doi:10.1212/WNL.0000000000003509
2. Begley CE, Beghi E. The economic cost of epilepsy: a review of the literature. *Epilepsia* 2002;43:3–9. doi:10.1046/j.1528-1157.43.s.4.2.x
3. Murray CJL, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet* 2012;380:2197–223. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61689-4
4. Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, et al. Epilepsy: new advances. *Lancet* 2015;385:884–98. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60456-6
5. Perucca P, Gilliam FG. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol* 2012;11:792–802. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70153-9
6. Kwan P, Sander JW. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1376–81. doi: 10.1136/jnnp.2004.045690
7. Luoni C, Bisulli F, Canevini MP, et al.; SOPHIE Study Group. Determinants of health-related quality of life in pharmacoresistant epilepsy: results from a large multicenter study of consecutively enrolled patients using validated quantitative assessments. *Epilepsia*. 2011;52(12):2181-91. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03325.x.
8. Perucca P, Carter J, Vahle V, Gilliam FG. Adverse antiepileptic drug effects: toward a clinically and neurobiologically relevant taxonomy. *Neurology*. 2009;72(14):1223-1229. doi:10.1212/01.wnl.0000345667.45642.61
9. Johannessen Landmark C, Johannessen SI, Patsalos PN. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs: current status and future prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*.2020;16(3):227-238. doi: 10.1080/17425255.2020.1724956.
10. Contin M, Albani F. Il monitoraggio terapeutico dei farmaci in neurologia. *Biochim Clin*. 2014;38(3):175-182.
11. 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. 2008;49(7):1239-1276. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01561.x
12. Protti M, Mandrioli R, Mercolini L. Tutorial: volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Anal Chim Acta* 2019;1046:32–47.
13. D'Urso A, Rudge J, Patsalos PN, et al. Volumetric absorptive microsampling: a new sampling tool for therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 2019;41:681–92.
14. Licchetta L, Trivisano M, Baldin E, et al. TELEmedicine for EPilepsy Care (TELE-EPIC): Protocol of a randomised, open controlled non-inferiority clinical trial. *BMJ Open*. 2021;11(12):1-8. doi:10.1136/bmjopen-2021-053980
15. Linder C, Hansson A, Sadek S, et al. Carbamazepine, lamotrigine, levetiracetam and valproic acid in dried blood spots with liquid chromatography tandem mass spectrometry; method development and validation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*

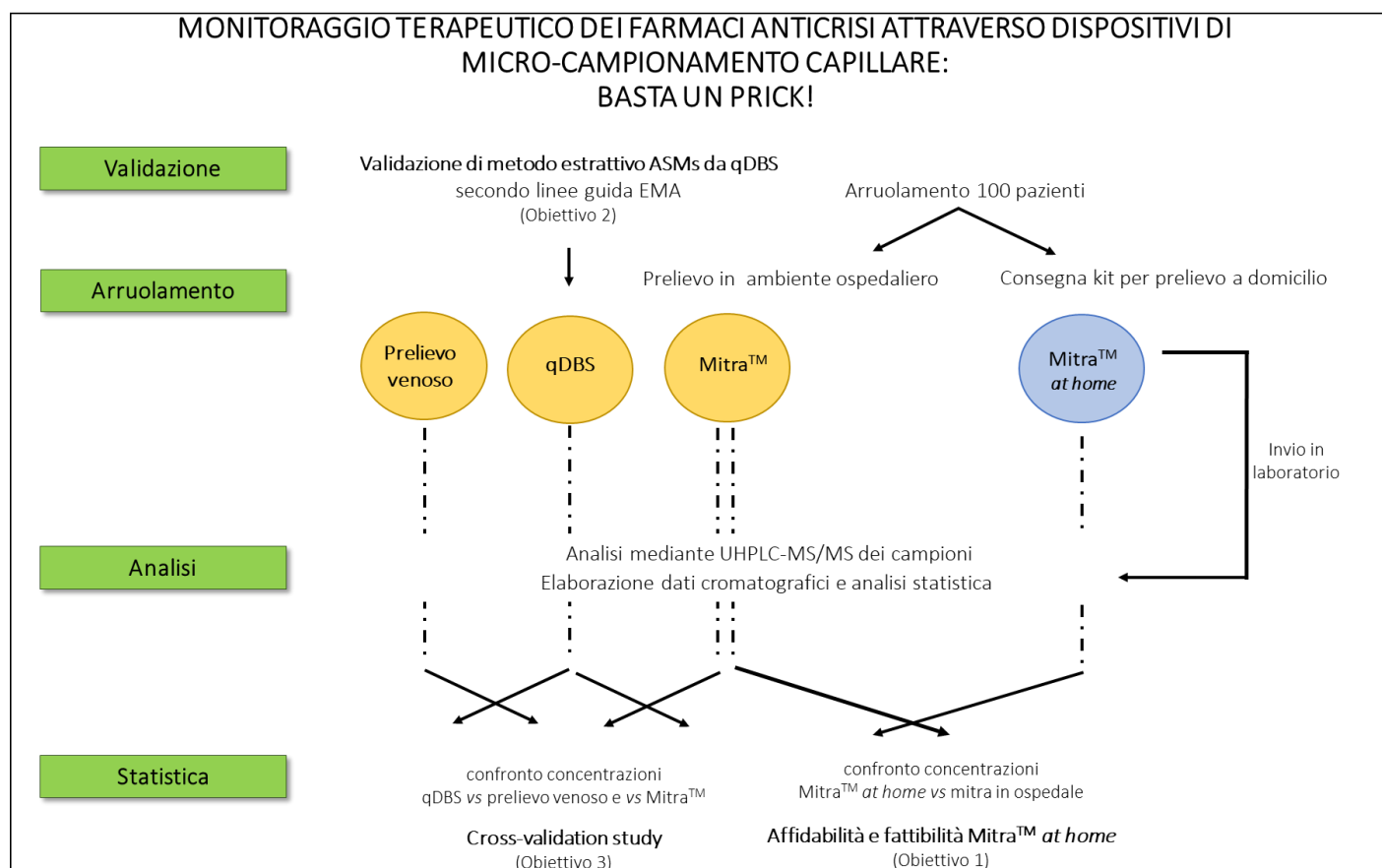
2018;1072:116–22. doi:10.1016/j.jchromb.2017.11.005

16. Velghe S, Stove CP. Evaluation of the Capitainer-B Microfluidic Device as a New Hematocrit-Independent Alternative for Dried Blood Spot Collection. Anal Chem. 2018;90(21):12893-12899. doi:10.1021/acs.analchem.8b03512

17. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA guideline on bioanalytical method validation, 2011.

Piano Temporale del Progetto (schema di Gantt)												
Attività	Anno 1						Anno 2					
	Mese 1-2	Mese 3-4	Mese 5-6	Mese 7-8	Mese 9-10	Mese 11-12	Mese 1-2	Mese 3-4	Mese 5-6	Mese 7-8	Mese 9-10	Mese 11-12
Invio documentazione per approvazione Comitato Etico, preparazione di modulistica ad hoc	■	■	■									
Messa a punto del metodo di estrazione di ASMs da dispositivo qDBS e validazione secondo le linee guida EMA (task 2.1)			■	■	■							
Verifica della stabilità degli analiti (ASMs) nel dispositivo qDBS e validazione secondo le linee guida EMA (task 2.2)					■	■						
Arruolamento di 100 pazienti: - prelievo di 1 campione di sangue venoso, 1 di sangue capillare mediante Mitra™ e 1 con qDBS - consegna di kit per l'auto-campionamento a domicilio con Mitra™					■	■	■					
- Esecuzione delle analisi in laboratorio dei campioni di plasma e dei dispositivi (Mitra™ e qDBS) mediante UHPLC-MS/MS - Raccolta dei campioni Mitra™ spediti dai pazienti					■	■	■	■				
Elaborazione dati cromatografici e analisi statistica: - confronto delle concentrazioni di ASMs rilevate attraverso dispositivo Mitra™ a domicilio vs ambiente ospedaliero (task 1.1); - confronto delle concentrazioni di ASMs rilevate con qDBS vs prelievo venoso (Task 3.1) e vs Mitra™ (Task 3.2) eseguiti in ambiente ospedaliero							■	■	■			
Verifica della fattibilità del microcampionamento a domicilio (Task 1.2)					■	■	■					
Stesura dei risultati e pubblicazione del lavoro										■	■	■

Sintetico schema grafico del progetto



Piano economico

	costo totale del progetto	quota richiesta a Fondazione LICE	quota cofinanziata	Ente cofinanziatore
Personale di ricerca	37.500	25.000	12.500	IRCCS – Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna
Attrezzature	-	-	-	
Materiali di consumo	11.000	11.000	-	
Servizi informatici	-	-	-	
Partecipazioni a congressi e collaborazioni (max 10%)	2000	2000	-	
Costi di pubblicazione	2000	1000	1000	IRCCS – Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna
Overheads (max 10%)	1000	1000	-	

Dettaglio delle spese previste

Personale di ricerca: borsa di studio della durata di 18 mesi (25.000 x 12 mesi) per farmacista con provata esperienza nell'analisi e validazione tecnica di metodi bio-analitici quantitativi e della tecnologia VAMS.

Materiali di consumo:

- Dispositivo Mitra™, Neoteryx x n. 300: 1 Mitra™ /pz per prelievi ospedalieri, 1 Mitra™ /pz per prelievo at-home (+ 1/pz di riserva) = 2000 euro
- Dispositivo qDBS, Capitainer x n. 300: 1 qDBS/pz per prelievo + 200 per studio di validazione = 2000 euro
- Kit Quantificazione ASMs Chromsystem (comprensivo di colonna cromatografica, standard interno, calibratori, fasi mobili) = 2500 euro
- Vial, tappi, filtri, siringhe, eppendorf, puntali = 2000 euro
- Reagenti = 2500 euro

Partecipazioni a congressi e collaborazioni: divulgazione dei risultati scientifici a congressi nazionali/internazionali di epilettologia e sul TDM

Overheads: includono le spese di spedizione per l'invio del Mitra™ at home in laboratorio.

Piano Economico del Progetto di Ricerca FONDAZIONE LICE