6° Congresso Regionale SIBioC
Sezione Sicilia

Il ruolo della Medicina di Laboratorio nella pratica clinica

Modica (RG), 8-9 ottobre 2009

Presidenti

Marcello Ciaccio, Michele Giavatto

Presidenti Onorari

Salvatore Macaione, Guglielmo Magro, Stefano Miccichè

Comitato Scientifico

Francesco Amato (Palermo) - Ignazio Brusca (Palermo)
Vittorio Calabrese (Catania) - Marcello Ciaccio (Palermo)
Giuseppe Falliti (Messina) - Franco Ferrara (Agrigento)
Giuseppe Friscia (Agrigento) - Francesco Gervasi (Palermo)
Michele Giavatto (Ragusa) - Riccardo Ientile (Messina)
Maria Agata Mangano (Catania) - Stefano Miccichè (Palermo)
Paolo Mingoia (Caltanissetta) - Roberto Pace (Enna) - Marcella Renis (Catania)

Comitato Organizzatore

Michele Giavatto (Presidente) - Giorgio Cavallo - Marcella Favaccio,
Rosa Giordano - Giuseppe Lavima - Giuseppe Militello
Alessandro Modica - Ausilia Nicosia - Rodolfo Pisani

Segreteria Scientifica

Barbara Tomaselli (Catania) - Giulia Bivona (Palermo) - Riccardo Ientile (Messina)
Bruna Lo Sasso (Palermo) - Pietro Noto (Ragusa)

Con il Patrocinio

Università degli Studi di Palermo, Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Palermo,
Università degli Studi di Catania, Università degli Studi di Messina,
Provincia Regionale di Ragusa, Comune di Modica,
Ordine dei Medici Chirurghi della Provincia di Ragusa

Nota dell'Editore:
I riassunti sono stati riprodotti senza alcuna revisione editoriale dal materiale direttamente fornito dagli autori.

LA TRASLOCAZIONE T(14;18) QUALE MARKER DI TRASFORMAZIONE NEI LINFOMI HCV ASSOCIATI

M. Libra, A.E. Russo, F. Stivala

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Catania

I linfomi MALT rappresentano circa l'8% dei linfomi non-Hodgkin. Essi si sviluppano principalmente nell'apparato gastrointestinale e spesso in seguito a stimolazione cronica di cellule B indotta da processi autoimmunitari o in seguito ad un infezione persistente, come quella da Helicobacter pylori o dal virus dell'epatite C (HCV).
Tra le numerose anomalie genetiche coinvolte nello sviluppo dei linfomi MALT, abbiamo recentemente dimostrato che la traslocazione t(14;18)-(IgH;Bcl-2) si verifica tra i pazienti affetti da HCV.
La traslocazione t(14;18) è stata anche trovata nel linfoma B diffuso a grandi cellule (DLBCL) derivato dal linfoma B di basso grado. E' da notare che i linfomi MALT occasionalmente possono trasformarsi ed evolvere in linfoma ad alto grado. Pertanto abbiamo ipotizzato che la traslocazione t(14;18) possa giocare un ruolo nella progressione del linfoma MALT associato all'infezione da HCV.
Per questo scopo abbiamo analizzato la traslocazione t(14;18) al major break point region (MBR) e al minor cluster region mediante PCR. I campioni di DNA tumorale erano stato ottenuti da biopsie metacrone di pazienti con linfoma MALT che hanno sviluppato DLBCL in presenza o meno dell'infezione da HCV.
La traslocazione t(14;18) è stata anche analizzata in un gruppo di controllo di DLBCL de novo senza evidenza clinica di un preesistente linfoma.
I risultati del presente studio confermano che la traslocazione t(14;18)
è una mutazione che si verifica nei linfomi HCV-associati e dimostrano per la prima volta che i linfomi MALT aventi la traslocazione Bcl-2 sono maggiormente predisposti a progredire verso l'alto grado.

ANALISI MUTAZIONALE DI KRAS, BRAF E PIK3CA NEI CARCINOMI METASTATICI DEL COLON-RETTO

L. Memeo

Responsabile del Servizio di Anatomia Patologica, Istituto Oncologico del Mediterraneo, Viagrande (CT)

La crescita e progressione del carcinoma colo-rettale è un processo multifasico che origina dall'accumulo sequenziale di mutazioni di oncogeni e geni oncosoppressori oltre che da alterazioni epigenetiche. L'identificazione di fattori predittivi molecolari di risposta ad uno specifico trattamento ha l'obiettivo di attuare una più razionale selezione dei pazienti candidati ad una data terapia. L'EGFR è stato il primo marcatore ad essere selezionato quale potenziale fattore predittivo di risposta alla terapia con inibitori dell'EGFR. EGFR è una glicoproteina transmembrana di 170 kd appartenente ad una famiglia di recettori strutturalmente correlati, noti come erb B. L'espressione di EGFR è correlata ad una prognosi peggiore. EGFR viene attivato dal legame con diversi ligandi endogeni, tra cui EGF, TGF-α. Le due principali vie di trasmissione del segnale sono rappresentate dai pathway RAS/RAF/MAPKT e PI3K/AKT, entrambi coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'invasione, nell'angiogenesi e nella metastatizzazione. La sua espressione in campioni tumorali puo' essere determinata mediante metodiche di immunoistochimica o di ibridazione in situ fluorescente (FISH). L'introduzione di anticorpi monoclonali anti-EGF-R quali il cetuximab ed il panituximab ha mostrato una risposta clinica solo nel 10% - 30% dei pazienti con malattia metastatica del colon-retto. Pertanto l'espressione del recettore non è sufficiente a predire la risposta a tali terapie e si è resa necessaria l'identificazione di altri marcatori molecolari.
Le mutazioni del gene K-RAS, presenti in circa il 30-50% di mCRC ed associate ad una prognosi sfavorevole, sono state identificate come markers molecolari di resistenza agli agenti anti-EGFR .
L'oncogene umano KRAS è mutato in circa il 30% dei carcinomi del colon. Fino ad oggi sono state identificate 3000 mutazioni puntiformi a carico del gene. Le mutazioni più frequenti sono state identificate nel codone 12 (82% delle mutazioni riportate) e 13 (17%) nell'esone 2. Sono state inoltre descritte mutazioni nel codone 61 e 146 ma rappresentano una percentuale minoritaria (1-4%) e la loro rilevanza clinica non è stata ancora chiarita.
Il gene KRAS codifica per una proteina G monomerica che funziona a valle del segnale indotto da EGFR. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine RAS coinvolte nella traduzione del segnale da recettori presenti sulla superficie cellulare a targets intracellulari attraverso pathway quali RAS/ MAPK. Le proteine RAS normalmente passano da uno stato attivo (RAS-GTP) ad uno stato inattivo (RAS-GDP). La serina-treonina chinasi B-RAF viene attivata dall'interazione diretta con RAS-GTP. In condizioni fisiologiche i livelli di RAS-GTP in vivo sono strettamente controllati, mentre le mutazioni del gene risultano in proteine che sono permanentemente nella forma attiva (RAS-GTP). Tali proteine aberranti sono in grado di trasmettere il segnale di EGFR anche senza la sua attivazione. Per questo motivo lo stato mutazionale di KRAS ha un notevole impatto sulle decisioni terapeutiche dei pazienti con carcinoma metastatico. Le mutazioni di KRAS conferiscono resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali anti EGFR. Sulla base di questi dati, l'EMEA (European Medicines Agency) ha approvato l'utilizzo di cetuximab e panitumumab solo per il trattamento di pazienti wild-type per il gene KRAS. Tuttavia la mutazione di KRAS è responsabile solo della mancata risposta clinica del 30-40% dei pazienti. L'identificazione di altri marcatori molecolari è pertanto una priorità nella terapia anti EGFR.
Le mutazioni attivanti di B-RAF sono state recentemente descritte come un evento oncogenico alternativo nei pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico in assenza di mutazioni di KRAS.

A livello proteico, la mutazione V600E stimola l'attività di B-raf attraverso l'attivazione della cascata MEK/ERK. Esse sono state riscontrate in circa il 10% dei carcinomi del colon.
Recentemente è stato dimostrato che anche mutazioni attivanti di PIK3CA possano contribuire alla resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali dei pazienti affetti da carcinoma metastatico, PIK3CA, che codifica per la subunità catalitica di PI3K, è mutato nel 20% circa dei tumori metastatici del colon, ed è responsabile dell'attivazione di AKT. Tali mutazioni sono localizzate nell'esone 9 (E524K, E545K,) e nell'esone 20 (H1047R). Le mutazioni di PIK3CA e la successiva attivazione di AKT giocano un ruolo importante nello sviluppo del carcinoma del colon ed il comportamento clinico e rappresentano un promettente marcatore molecolare nelle terapie con anticorpi monoclonali.

IMPLICAZIONI DIAGNOSTICHE E TERAPEUTICHE DELL'OSSIDO NITRICO E DI YIN YANG 1 NEL CANCRO

F. Nicoletti

Ordinario di Scienze Tecniche di Medicina di Laboratorio, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Catania

E' ormai noto il ruolo fondamentale che il fattore di trascrizione Yin Yang 1 (YY1) giochi nei normali processi biologici quali l'embriogenesi, la differenziazione, la regolazione e la proliferazione cellulare. YY1 esercita i suoi effetti sui geni coinvolti in questi processi grazie alla sua capacità di iniziazione, attivazione o repressione della trascrizione secondo la struttura cui si lega. Il ruolo del YY1 nella cancerogenesi è stato oggetto di studio solo negli ultimi anni. Recenti studi hanno dimostrato come i livelli di espressione di YY1 nei tumori giochino un ruolo importante nella progressione neoplastica e nell'apoptosi indotta dalla terapia. Da qui si evince come la regolazione dell'espressione del YY1 nel cancro e lo sviluppo di nuove terapie mirate siano da considerare nuove strategie nella lotta contro il cancro. In questo studio abbiamo posto l'attenzione sul significato diagnostico e terapeutico di YY1 con particolare attenzione ai tumori ematologici, tra cui i linfomi non-Hodgkin (NHL). Essi sono un gruppo eterogeneo di malattie linfoproliferative maligne con pattern di comportamento e risposta alla terapie molto variabili tra loro. Mentre alcuni pazienti rispondono alle terapie convenzionali molti altri recidivano divenendo refrattari ad ulteriori trattamenti. Vari studi su linee cellulari di B-NHL hanno evidenziato che il fattore di trascrizione YY1 è coinvolto nella regolazione della resistenza sia alla chemioterapia che ai farmaci immunoterapici. Noi abbiamo esaminato il ruolo di YY1 nello sviluppo e nella progressione dei linfomi non-Hodgkin. I livelli di espressione di YY1 sono stati determinati mediante IHC e western. L'analisi dell'espressione genica e l'associazione del YY1 con particolari caratteristiche cliniche sono state valutate utilizzando tre differenti database di microarray per campioni bioptici ottenuti da linfomi. I risultati hanno evidenziato nuovi punti, vale a dire, (1) i livelli di espressione di YY1 aumentavano in relazione alla trasformazione delle cellule B, suggerendo un suo coinvolgimento nella trasformazione neoplastica verso il linfoma di Burkitt e i linfomi diffusi a grandi cellule B (2) la iperespressione di YY1 è stata trovata in un sottogruppo di pazienti con indice di proliferazione positivo (3) tra tutti i parametri clinici considerati, è stata trovata una significativa correlazione tra BCL6 e l'espressione di YY1. La presenza del gene BCL6 era associata con elevati livelli di YY1 (4) un'analisi multivariata della sopravvivenza ha evidenziato che l'espressione di YY1 era un marcatore prognostico indipendente e (5) i suoi livelli di espressione correlavano con la sopravvivenza globale. (6) La down-regolazione di YY1 sensibilizza le cellule di NHL al trattamento con "donors" di ossido nitrico.

ANALISI DI MATRICI ALTERNATIVE ALL'URINA PER L'ACCERTAMENTO DI ASSUNZIONE DI SOSTANZE D'ABUSO: ASPETTI TOSSICOLOGICI E GIURIDICI

M.C. Rotolo

Istituto Superiore di Sanità , Dipartimento del Farmaco Reparto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping

Le matrici biologiche, sulle quali viene effettuata la ricerca tossicologica, possono essere distinte in convenzionali o classiche e non convenzionali. Le prime sono costituite dal sangue e dall'urina, substrati oramai universalmente utilizzati e sui quali vi è ampia convergenza sia nell'approccio analitico-metodologico sia nell'interpretazione dei risultati. Tra le matrici non convenzionali si annoverano invece le formazioni cheratiniche, la saliva, il sudore e il meconio.
La scelta, quando possibile, del campione biologico sul quale eseguire la ricerca è vincolata sia dalla disponibilità del campione che dalla finalità dell'accertamento.
Quando si utilizza il sangue le informazioni che si ottengono, sono essenzialmente quelle della "attualità d'uso" di una determinata sostanza; condizione richiesta specificatamente in molti dispositivi legislativi per l'applicazione delle relative sanzioni. Il problema principale relativo al prelievo ematico è la sua invasività, che impone limitazioni alla sua utilizzazione.
L'urina è a sua volta molto utile quando l'obiettivo dell'indagine è quello di verificare, ad esempio, se un soggetto abbia fatto uso di una o più sostanze. Un risultato positivo indica che vi è stata assunzione o somministrazione o esposizione ad una certa sostanza in un intervallo cronologico più ampio rispetto al campione ematico. Il prelievo dell'urina è semplice, non invasivo e consente di ottenere grandi volumi di campione con elevate concentrazioni delle sostanze indagate, grazie ai fenomeni di filtrazione e concentrazione renale
Altre matrici infine, come le formazioni pilifere, sono di

larga utilizzazione in tossicologia forense, in quanto permettono, con le dovute cautele, di ottenere informazioni di tipo "storico" relativamente alle abitudini tossicomaniche. Analoga utilizzazione hanno le indagini sulle unghie che - sia pure orientativamente – consentono di attestare un uso pregresso e più o meno continuato.
Recentemente sono stati avviati numerosi studi sperimentali, al fine di valutare la possibilità di effettuare analisi chimico-tossicologiche sulla saliva. Allo stato alcune ricerche sperimentali, che sono state già pubblicate, forniscono dati incoraggianti circa l'utilizzo della saliva in tossicologia forense. Tuttavia sono necessarie ulteriori ricerche per dimostrare una stretta correlazione tra concentrazione salivare e plasmatica delle sostanze indagate e definire i criteri interpretativi dei risultati ottenuti.
Nei settori del controllo sul luogo di lavoro e/o nell'antidoping l'uso della saliva in alternativa all'urina presenterebbe alcuni importanti vantaggi:
la possibilità di effettuare il prelievo sotto controllo diretto eliminando i rischi di adulterazione e di sostituzione del campione che attualmente costituisce il principale problema di ordine medico-legale relativo all'urina;
il rispetto della sfera privata del soggetto senza compromissione della catena di custodia;
la possibilità di individuare la sostanza assunta piuttosto che i metaboliti.

VALUTAZIONE DELL'APPLICAZIONE DEI PROTOCOLLI REGIONALI PER GLI ACCERTAMENTI SANITARI DI ASSENZA DI TOSSICODIPENDENZA

R. Gagliano-Candela

Cattedra di Tossicologia Forense, Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università di Bari

Premesse
In base alla conferenza Stato/Regioni in materia di accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi (Conf. Un. n. 99 del 30 ottobre 2007 e Accordo n. 178 del 18 settembre 2008) gli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso nei reperti biologici assumono elemento discriminante nella prosecuzione di una attività lavorativa. Per tali motivi deve possedere requisiti certi di trasparenza ed uniformità che devono essere rintracciabili in maniera costante nell'operato di tutti i laboratori del settore specifico.
Poiché la legge prevede che ogni Regione italiana debba recepire gli atti d'intesa, nasce l'esigenza di una valutazione dei protocolli ragionali al fine di uniformare, per quanto possibile, tutte le procedure operative che concorrono alla formazione ed alla interpretazione del risultato degli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso.
Un alto livello qualitativo dei risultati degli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso viene assicurato non solo dall'utilizzo di metodiche e tecniche largamente sperimentate, ma anche dalla certezza che gli stessi risultati provengano da strutture che dispongono di organizzazioni efficaci ed affidabili nel tempo.
Quindi lo scopo del presente protocollo è sintetizzabile nei seguenti punti:
- mettere a disposizione dei laboratori di tossicologia dei punti di riferimento per un corretto approccio al problema;
- fornire indicazioni e raccomandazioni su come gestire ogni processo analitico;
- cautelare le strutture nelle emissioni e nella gestione dei risultati degli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso.

Finalità del protocollo
Il presente documento ha la finalità di consentire ai competenti servizi delle Aziende ASL, ai Datori di Lavoro e ai medici competenti l'applicazione uniforme e condivisa delle procedure diagnostiche e medico legali per l'accertamento di assenza di tossicodipendenza per i lavoratori da adibire o adibiti alle mansioni a rischio di cui all'allegato 1 del Provvedimento CU 99/2007.
Nella predisposizione delle presenti procedure, si è comunque tenuto conto:
- delle indicazioni contenute nelle "Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi" approvate con Accordo dalla Conferenza Unificata tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano nella seduta del 18 settembre 2008 (Rep. Atti n. 178);
- dell'organizzazione del sistema sanitario pugliese e dell'articolazione dei servizi interessati alle presenti procedure;
- della necessità di effettuare gli accertamenti nel rispetto della dignità della persona e della privacy;
- della necessità del rispetto delle norme di garanzia circa l'oggetto dell'accertamento;
- della necessità di proporre procedure ed accertamenti che permettano di fornire gli indispensabili elementi di valore obiettivo e scientifico che possano fungere da valido supporto al giudizio medico ed alle successive azioni ad esso conseguenti;
- della necessità di tutelare la salute e la sicurezza dei terzi e del lavoratore e nel contempo evitare eventuali e arbitrarie "etichettature" di tossicodipendenza o comunque di consumatori di sostanze stupefacenti e /o psicotrope.

Le indicazioni procedurali e di accertamento previste dal presente documento si rendono necessarie per gli adempimenti derivanti dal Provvedimento n. 99 approvato dalla Conferenza Unificata Stato-Regioni il 30 ottobre 2007 "Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, in materia di

accertamento di assenza di tossicodipendenza" e dall'Accordo approvato dalla Conferenza Unificata tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano nella seduta del 18 settembre 2008 (Rep. Atti n. 178) sul documento recante "Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi".

Struttura del protocollo

Le procedure descritte nel presente lavoro devono esattamente inquadrare i seguenti punti:

1. Soggetti cui è applicabile l'accertamento
2. Tipologie degli accertamenti sanitari, suddivise in due macrofasi :
   - la prima delegata al medico competente;
   - la seconda delegata alle strutture sanitarie competenti (U.O. SerT) individuate nell'art. 2, comma 1, della CU n. 99 del 30 ottobre 2007.
3. Adempimenti procedurali a carico delle Aziende ASL
4 Prima Macrofase: Procedure accertative di primo livello da parte del medico competente
4.1 Adempimenti a carico dei datori di lavoro
4.2 Accertamenti di primo Livello
4.2.1 La visita medica
4.2.2 Campionamento e Test tossicologico analitico di primo livello (test di screening): indicazioni generali e valori soglia
4.2.3 Esami di laboratorio di I Livello
   - I° opzione "Raccolta del campione ed esecuzione del test da parte del medico competente.
   - II opzione - Raccolta del campione a cura del medico competente ed esecuzione in laboratorio del test immunochimico
   - III opzione "Raccolta del campione ed esecuzione del test da parte di struttura laboratoristica autorizzata.

4.2.4 Esami di conferma e valori soglia
4.2.4.1 Procedure da eseguire al termine della prima macrofase (Visita + screening + conferma GC/MS o LC/MS).
5. Seconda Macrofase, Procedure di secondo livello di competenza delle UU.OO SerT. delle AASSLL
5.1 Accertamenti clinico-diagnostici di II livello
5.2 Accertamenti tossicologici-analitici
Opzione a): Su n. 1 esame su urina da analizzare in metodica immunochimica associato ad n. 1 esame su matrice pilifera
Opzione b): Su n. 3 esami su urina da analizzare in metodica immunochimica.
5.3 Accertamenti su matrice cheratinica
Per i capelli, Per i peli; Verbale di prelievo; Analisi di laboratorio
5.4 Valutazione dei risultati su matrice pilifera
5.4.1 Concentrazione soglia (cut-off) nei test su matrice pilifera
5.5 Certificazione SerT (o SerD)
6. Controanalisi
7. Smaltimento dei campioni
8. Tariffe
9. Allegato: modulistica suggerita

Considerazioni conclusive

In considerazione del carattere innovativo degli accertamenti sull'uso di sostanze stupefacenti nei lavoratori e delle ricadute in termini sanitari, economici e sociali, nonché di formulazione del giudizio di idoneità alla mansione specifica, si suggerisce che il protocollo sia soggetto a monitoraggio e rivalutazione dopo dodici mesi dalla sua entrata in vigore, a cura della medesima commissione che ha provveduto a definirlo.

NUOVI MARCATORI PER LA DIAGNOSI DI ALCOL DIPENDENZA E LORO UTILIZZO IN AMBITO LAVORATIVO

M.A. Mangano

Laboratorio di Chimica Clinica e Tossicologica, Catania

L'alcol è da tempo considerato il terzo fattore di rischio più importante per la salute poiché, oltre ad essere una sostanza psicotropa che può dare dipendenza, è causa di molte patologie di varia natura nonché di gravi eventi traumatici, incidenti e disordini sia mentali che comportamentali.

Le statistiche correnti indicano che il 20-30% dei costi relativi a spese sanitarie di cura e ospedalizzazione sono da correlare all'abuso di alcol. Pertanto, oltre a sviluppare politiche più efficaci per ridurre i consumi alcolici dell'intera popolazione, è importante poter contare su esami biochimici che possano evidenziare precocemente tale abuso. Il governo italiano si è fatto carico di tale problema e, nel corso degli anni, ha provveduto ad emanare una serie di leggi che regolamentano i consumi e i controlli per quelle attività lavorative che comportano rischi professionali.

L'etanolo, essendo una molecola idrosolubile, si diffonde facilmente nei tessuti e agisce come depressore del sistema nervoso centrale. Per la maggior parte, circa il 90%, esso viene metabolizzato a livello epatico mediante reazioni ossidative il cui prodotto finale è l'acetilCoA che entra nel ciclo di Krebs e, se in eccesso, partecipa alla sintesi di acidi grassi e colesterolo. Una seconda via di metabolizzazione è quella non ossidativa che porta alla formazione di esteri etilici degli acidi grassi, etil-glucuronato, etil-solfato e fosfatidiletanolo a seconda degli enzimi coinvolti nelle reazioni.

Ad oggi sono diversi i marcatori che permettono di evidenziare un uso cronico di alcol, ma la specificità e sensibilità dei metodi analitici è purtroppo influenzata da vari fattori tra cui la variabilità genetica, le patologie epatiche di altre origini, l'assunzione di farmaci e i fattori ormonali. Tali marcatori possono essere classificati sia come marcatori di stato sia come marcatori genetici. I marcatori di stato sono a loro volta distinti in marcatori diretti, quando rivelano i prodotti del metabolismo

dell'alcol assunto, e marcatori indiretti quando rivelano un danno d'organo dovuto all'abuso.
Un marcatore che sicuramente permette di evidenziare l'abuso di alcol prolungato nel tempo e i problemi epatici ad esso correlati, è la transferrina carboidrato carente (CDT) che, per le sue caratteristiche, è sicuramente un marcatore altamente specifico. I pochi falsi positivi o falsi negativi che si possono riscontrare sono legati sicuramente alla presenza delle varianti genetiche B e D della transferrina. La tecnica analitica di riferimento per la sua determinazione è l'HPLC che, consentendo di individuare la presenza delle suddette varianti, minimizza la possibilità di errori. Negli ultimi anni si sono ricercati nuovi marcatori che permettano di ottenere maggiore specificità e sensibilità nella diagnosi di abuso alcolico mediante analisi eseguite su matrici biologiche convenzionali e non. Fra questi marcatori l'etil-glucuronato presenta sicuramente, rispetto agli altri, ottime qualità diagnostiche con specificità e sensibilità tali da consentire la copertura della finestra temporale esistente tra marcatori a breve e a lungo termine. È stato stimato che circa lo 0.02 - 0.06% dell'etanolo assunto è trasformato in etil-glucuronato che può essere dosato nel sangue, nelle urine e nei capelli.
Il dosaggio nel sangue permette di allargare la finestra temporale di rivelabilità dell'assunzione di alcol; ciò può essere utile sia nei prelievi ematici ritardati eseguiti nei casi di incidente stradale, sia nei casi di analisi post mortem per escludere la presenza di etanolo dovuta a fermentazione batterica o a contaminazione esterna.
Nelle urine l'etil-glucuronato è rivelabile per un periodo di tempo molto più a lungo, sicuramente di almeno 10 volte superiore, rispetto all'etanolo. Può quindi essere utilizzato nei casi di campionamento tardivo e per monitorare i pazienti in trattamento di disintossicazione o in attesa di trapianto epatico. Anche la determinazione quantitativa nella matrice cheratinica ha permesso l'ampliamento della finestra temporale, così da poter discriminare fra abuso recente e abuso in tempi pregressi. Essendo, come già detto, un metabolica diretto dell'alcol, l'etil-glucuronato è presente nel capello solo a seguito dell'effettivo abuso alcolico per cui, rispetto ai marcatori tradizionali, presenta sicuramente una maggiore specificità. La determinazione nella matrice cheratinica presenta inoltre molti vantaggi quali la non invasività del prelievo, la facile conservazione, la stabilità degli analiti e una specificità sovrapponibile a quella della CDT con una sensibilità almeno doppia rispetto a quest'ultima. Per tali motivi e considerando che la società scientifica SoHT ha già definito i valori di cut-off utili a discriminare fra bevitore moderato e bevitore non moderato, l'esame può essere usato, con buoni risultati, oltre che nel monitoraggio dei pazienti in astinenza, anche nella verifica dell'idoneità alla guida.
La tecnica analitica che presenta maggiore sensibilità e specificità nella determinazione dell'etil-glucuronato nelle varie matrici biologiche è la cromatografia liquida accoppiata alla massa (LC-MS-MS).
Recentemente è stato messo a punto anche un metodo immunoenzimatico che, comparato alla LC/GC -MS-MS, presenta una buona correlazione quantitativa e sensibilità e specificità superiori al 98.5%. Tale metodo, specifico per le urine, ha il vantaggio di essere un test di screening facilmente eseguibile in tutti i laboratori; esso richiede però, se utilizzato ai fini legali, una conferma con la LC-MS-MS.
Quanto sopra esposto consente la proposta di un protocollo operativo che preveda, nel monitoraggio dei lavoratori a rischio, la determinazione della CDT sierica e dell'etil-glucuronato nelle urine e, nei casi di verifica di idoneità alla guida, la sostituzione del dosaggio della CDT sierica con quello dell'etil-glucuronato nei capelli.

IL LABORATORIO NELL'URGENZA CARDIOLOGIA

D. Di Raimondo

Ricercatore di Metodi e Didattiche delle Attività Motorie U.O. di Fisiopatologia Circolatoria, Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università degli Studi di Palermo

La diagnosi di laboratorio in ambito cardiologico riveste un ruolo sempre crescente, anche nello specifico ambito delle urgenze cardiologiche dove, oltre a mantenere un ruolo fondamentale nella caratterizzazione del danno in corso di ischemia miocardica, si ritaglia nuovi spazi mediante la sempre maggiore validazione di nuovi marcatori. La caratterizzazione del paziente con dolore toracico, ancora oggi non può prescindere dal dosaggio dei marcatori bioumorali di ischemia miocardica. Il marcatore ideale di ischemia dovrebbe permettere di stabilire rapidamente una diagnosi di sindrome coronarica acuta (SCA), dovrebbe consentire la distinzione tra pazienti a basso ed alto rischio, dovrebbe essere misurabile rapidamente, con disponibilità del risultato al letto del paziente entro poche decine di minuti. Dovrebbe inoltre essere specifico, capace di distinguere l'ischemia dalla necrosi, e dovrebbe infine essere economico.
Il marcatore di necrosi miocardica per eccellenza di cui attualmente disponiamo è rappresentato dalla troponina, che mantiene caratteristiche di specificità elevatissima (molto superiori, per esempio, rispetto a qulle della CPK-mb) (1), pur con i limiti del ritardo con cui è dosabile nel sangue con i metodi attualmente disponibili. Il rilascio delle Troponine (Tn) in corso di ischemia miocardica infatti non è immediato, almeno utilizzando le metodiche oggi disponibili, ma ci vogliono circa 4-6 ore dall'insorgenza dei sintomi prima che queste risultino dosabili nel siero. È quindi teoricamente necessario fare due o tre prelievi prima che queste risultino dosabili, ritardando la diagnosi ed il trattamento delle SCA. (2).
Essendo il valore prognostico dell'aumento della troponina ormai confermato da una serie amplissima di studi clinici, appare opportuno che gli sforzi della ricerca si concentrino su un ulteriore affinamento e standardizzazione del dosaggio della troponina plasmatica, che consentano una diagnosi ancora più precoce. La ricerca di nuovi marcatori di ischemia miocardica ovviamente progredisce comunque, e numerose molecole vengono attualmente vagliate in

termini di sensibilità e di specificità ma anche di facilità di accesso alla metodica e di costo.
Alcuni dei nuovi indici biochimici testati, sono: altri marker diretti di ischemia e necrosi (per es. l' "albumina modificata dall'ischemia" od anche i Free Fatty Acids unbound [FFAu], che in corso di ischemia miocardica vengono rilasciati in grosse quantità (3); alcune interleuchine: IL6, IL-1, IL-10, TNF-α; alcuni marker di infiammazione (la proteina C reattiva, il ligando solubile del CD40, la mieloperossidasi, il PAI-1); alcuni markers di stress emodinamico (il BNP, la porzione N-terminale del relativo pro-ormone [NT-proBNP]. Il ruolo del BNP (Brain Natriuretic Peptide), uno dei marcatori bioumorali più poliedrici, in ambito delle patologie acute cardiologiche, si estende anche alla diagnosi differenziale delle dispnee acute, dove ha un ruolo ormai consolidato; il test rapido al letto del paziente nel dipartimento d'emergenza, ha mostrato un valore predittivo negativo del 96%, dimostrandosi utilissimo per differenziare la dispnea di origine cardiaca da quella derivante da altre patologie (4). La ricerca di nuovi marcatori di patologia cardiaca da utilizzare presso l'Area di Emergenza e che forniscano in pochi minuti dati affidabili e di pronta utilità nella diagnosi e nella prognosi del paziente acuto è in rapido progresso, ma occorre ricordare che il significato diagnostico e prognostico di questi nuovi parametri dovrà poi essere ampiamente verificato attraverso studi clinici su popolazioni ampie, prima di poterli inserire nelle Linee Guida.

BIBLIOGRAFIA

1. Jeremias A and Gibson CM. Alternative Causes for Elevated Cardiac Troponin Levels when Acute Coronary Syndromes Are Excluded. Ann Inter Med 2005;142:786-91
2. Panteghini M. Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology. European Heart Journal 2004;25:1187-96
3. Kleinfeld AM, Prothro D, Brown DL et al. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. Am J Cardiol 1996;78:1350-4
4. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med 2002;347:161-7.

LE TROPONINE NELL'IMA

C. Bellia

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

La necrosi miocardica è sempre accompagnata dal rilascio nell'interstizio cardiaco di proteine strutturali ed altre macromolecole intracellulari come conseguenza della perdita di integrità delle membrane citoplasmatiche. Dal momento della loro introduzione, le troponine cardiache rappresentano il gold standard per l'identificazione di Sindromi Coronariche Acute, in virtù della loro maggiore sensibilità e tessuto-specificità rispetto ad altri marcatori disponibili quali creatinachinasi (CK) e la sua isoforma MB (CK-MB), la mioglobina, la lattico deidrogenasi (LDH). L'elevata specificità delle troponine è riconducibile al fatto che, diversamente dalla CK, le cTnI e cTnT sono espresse unicamente dai miociti; inoltre, sono oggi disponibili test che prevedono l'impiego di anticorpi monoclonali specifici per epitopi esclusivamente cardiaci.
Il significato biochimico-clinico delle troponine non si limita però alla diagnosi di IMA, essendo le troponine impiegate anche per la stratificazione del rischio in pazienti con sospetta sindrome coronarica acuta. Esiste infatti una correlazione diretta tra la concentrazione plasmatica di troponina cardiaca nei pazienti con sindrome coronarica acuta ed il rischio di morte sia a breve che a lungo termine: tale correlazione trova spiegazione nel fatto che livelli crescenti di troponina indicano probabilmente un danno miocardico più esteso e quindi una funzione ventricolare depressa, tale da condizionare la prognosi del paziente.

NT- PRO BNP NELLA PATOLOGIA NON CARDIACA: LE DISFUNZIONI TIROIDEE

G. Bivona

Ricercatore di Scienze Tecniche di Medicina di Laboratorio, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Palermo

Il peptide natriuretico N terminale tipo B (NT-pro BNP) è prodotto e rilasciato a livello ventricolare ed appartiene alla categoria dei peptidi natriuretici, includenti il peptide natriuretico tipo A (ANP); questi rappresentano nella pratica clinica un utile strumento diagnostico nell'ambito della patologia cardiaca con particolare riferimento allo scompenso congestizio. In particolare, si ritiene che la patologia tiroidea, negli stati di ipo ed ipertiroidismo possa influenzare i livelli di NT-proBNP; studi caso controllo hanno infatti dimostrato come entrambi i peptidi natriuretici (ANP e NT-pro BNP) siano soggetti a notevole incremento in corso di ipertiroidismo, in contrasto con l'ipotiroidismo ed anche l'eutiroidismo che non determinano un incremento significativo dei livelli sierici di NT-pro BNP. Anche le concentrazioni di ormoni tiroidei sembra che possano influenzare i livelli sierici di NT-proBNP, ma non altrettanto è riportato per la tropina ipofisaria (TSH). Inoltre, va ricordato come la patologia tiroidea sia spesso causa di coinvolgimento cardiaco e come essa determini un'alterazione delle concentrazioni di tutte le molecole a basso peso molecolare includenti certamente i peptidi natriuretici.

NUOVE PROSPETTIVE DELLA FARMACOGENOMICA

F. Squadrito

Dipartimento Clinico Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Università di Messina

L'importanza dei fattori genetici sulla variabilità della risposta ai farmaci è stata ampiamente dimostrata ed

ha giustificato lo sviluppo di una specifica disciplina la farmacogenetica che studia il coinvolgimento dei geni, o di alcune loro mutazioni, nella risposta ai farmaci La farmacogenomica è invece la disciplina che affronta i problemi legati all'applicazione concreta nel paziente di tali informazioni ed il suo fine è quello di migliorare il profilo di efficacia e sicurezza dei farmaci e di consentire l'identificazione di una terapia farmacologica personalizzata in base al genotipo individuale. Pertanto per identificare il miglior trattamento farmacologico per un paziente, il medico può oggi utilizzare la farmacogenomica allo scopo di ottimizzare l'efficacia del farmaco e minimizzare lo sviluppo di reazioni avverse.
La risposta individuale ad un farmaco, in realtà, è multi-fattoriale, ed è dovuta alle interazione tra fattori estrinseci (ambiente, stili di vita) ed intrinseci (sesso, patologie concomitanti, predisposizione genetica). Gli studi di farmaco-genetica sulle interazioni farmaco-bersaglio biologico (farmaco-dinamica) o sul metabolismo dei farmaci (farmaco-cinetica) raccolgono informazioni sostanziali sull'influenza delle varianti geniche sulla risposta ai farmaci. L'uso routinario della genotipizzazione prima della terapia potrebbe favorire l'identificazione di responders, non responders e di pazienti ad elevato rischio di tossicità per classi di farmaci importanti quali quelli del sistema nervoso centrale, dell'apparato cardiovascolare e per numerose sostanze utilizzate nella terapia antineoplastica ed immuno-soppressiva.
Esistono diverse tecniche di biologia molecolare che possono essere utilizzate per rilevare specifiche sequenze di DNA ed RNA allo scopo di condurre tipizzazioni farmacogenetiche.
Per la maggior parte delle applicazioni che richiedono l'analisi di informazioni genetiche l'utilizzo di una metodica di amplificazione quale la polymerase chain reaction quantitativa in tempo reale (Real-Time PCR) rappresenta una tecnologia che consente analisi di farmaco-genetica accurate, affidabili e riproducibili.

ASPETTI DI FARMACOGENOMICA NELL'EPILESSIA: QUALI RICADUTE SUL PIANO CLINICO?

F. Pisani

Dipartimento di Neuroscienze,Università degli Studi di Messina

Negli ultimi anni la ricerca genetica ha rivoluzionato la nosografia delle epilessie, creando dei risvolti potenzialmente importanti anche in ambito terapeutico. Esempi in tal senso sono le mutazioni: a) laforina e malina nell'epilessia mioclonica progressiva di Lafora; b) SCN1A in un gene per i canali del sodio nella epilessia mioclonica severa di Dravet; c) cistatina B nell'epilessia mioclonica progressiva di Unverrichy-Lundborg. Nella mutazione SCN1A devono chiaramente essere evitati farmaci antiepilettici che bloccano i canali del sodio, quali fenitoina, carbamazepina, oxcarbazepina e lamotrigina. La selettività di risposta alla carbamazepina dell'epilessia frontale notturna autosomica dominante è stata spiegata come l'espressione di mutazioni che interessano i recettori per l'acetilcolina, presenti in pazienti affetti da tale forma di epilessia. Altro settore di notevole interesse è rappresentato dallo studio di proteine che trasportano i farmaci fuori dall'encefalo ("multi-drug transporter proteins), che impediscono il raggiungimento di una concentrazione di farmaco terapeuticamente sufficiente nel sito d'azione e che sarebbero sovra-espresse nei pazienti epilettici farmacoresistenti. La farmacogenomica, infine, ci ha aiutato a comprendere alcune notevoli differenze interindividuali o, anche, interrazziali osservate nella farmacocinetica di alcuni farmaci antiepilettici, quali la fenitoina.
I pazienti affetti da epilessia farmacoresistente sono circa il 30-40% ed il percorso attualmente intrapreso, che ha iniziato ad evidenziare l'influenza di fattori genetici nella risposta ai farmaci, potrebbe rivelarsi estremamente rilevante al fine di ridurre drasticamente tale percentuale.

POLIMORFISMI GENICI E SUSCETTIBILITÀ ALLA MALATTIA: UN APPROCCIO ALLA FARMACOGENETICA

N. Ferlazzo, R. Lentile

Dipartimento di Scienze Biochimiche, Fisiologiche e della Nutrizione, Università di Messina

Negli ultimi anni notevole interesse è stato rivolto alla determinazione dei polimorfismi genici quali fattori di rischio per numerose condizioni patologiche. Infatti è evidente, come la determinazione degli stessi può fornire un valido aiuto nella diagnosi precoce/terapia mirata/monitoraggio della terapia e si sostituisce ad una diagnosi e terapia tardiva (successiva all'espressione dei sintomi).
La farmacogenomica insieme alla farmacogenetica, discipline emergenti nella ricerca bio-medicale contribuiscono a predire, nel singolo individuo, efficacia ed effetti collaterali dei farmaci.
L'esito terapeutico causato dalla somministrazione di un farmaco difficilmente può essere previsto con certezza nel singolo paziente. La maggior parte dei pazienti risponderà alla terapia senza o con lievi ed accettabili effetti avversi, alcuni non risponderanno per nulla o avranno effetti avversi tali da richiedere la sospensione del trattamento.
Anche per diverse patologie neurodegenerative esistono indicazioni significative sia per quanto riguarda geni (e mutazioni di tali geni) associati a forme autosomiche dominanti, sia per quanto riguarda geni associati alla patologia come fattori di rischio. In quest'ultimo caso la caratteristica sporadica della malattia non può escludere una componente genetica complessa e fattori ambientali che influenzano gli eventi patogenetici e le variazioni fenotipiche della malattia ed infine la risposta ai trattamenti terapeutici.
La resistenza alla terapia farmacologica è una

complicazione che si registra con particolare frequenza nel trattamento di alcune patologie neurologiche, quali ad esempio alcuni tipi di epilessia.
Tra i geni coinvolti nella farmacoresistenza, quello maggiormente responsabile risulta essere MDR1, che codifica per la glicoproteina P, deputata al trasporto transmembrana dei farmaci (1).
Scopo della nostra ricerca, è stato quello di determinare il ruolo dei polimorfismi C3435T e G2677T/A del gene MDR1 in soggetti epilettici che non rispondono alla terapia.
Dati preliminari non indicano un particolare ruolo per il polimorfismo G2677T/A, al contrario il polimorfismo C3435T sembra essere associato al fenomeno della farmacoresistenza. L'allele C, già descritto in letteratura come fattore coinvolto nella farmacoresistenza, si presenta con una frequenza maggiore nei soggetti epilettici farmacoresistenti, rispetto ai soggetti responsivi alla terapia (0.55 vs 0.39).
Tuttavia, considerata la complessità del fenomeno della farmacoresistenza, non è da escudere il coinvolgimento di altri polimorfismi genici. Lo sviluppo di sistemi analitici molecolari in grado di studiare contemporaneamente le sequenze di più geni, quali quelli basati sulle tecnologia del microarray o gene-chip,
offre nuove possibilità di indagine con importanti prospettive applicative, consentendo quindi di avviare la terapia dopo aver caratterizzato dal punto di vista genico il singolo soggetto, e considerando la risposta al farmaco anche in base alla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP).

BIBLIOGRAFIA

1. Eichelbaum M et al. Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. Ther Drug Monit. 2004 Apr;26(2):180-5.

ABNORMAL POPULATION IN VCS SCATTERPLOTS AS INDICATORS OF CYTOMORPHOLOGICAL ABNORMALITIES: CASE-REPORT OF PLASMA CELL LEUKEMIA

F. Gervasi [1], L. Carnevale[1], S. Vlah[1], A. Ferraro[1], C. Giambanco[1], G. Pagnucco[1]

[1]U.O. Ematologia Dipartimento Oncologia, ARNAS Civico e G. Di Cristina, Palermo

In our hematology laboratory,recently we have introduced two Coulter LH series hematology analysers (LH 780 and LH 500) that use the VCS (Volume, Conductivity and Light scatter) technology to obtain a direct 5-population leukocyte differential on the basis of volume, nuclear/cytoplasm ratio and granularity.As reported on the literature, we are investigating if abnormal distribution found in several pathologies are consistent with cellular abnormalities, in order to find "typical abnormal pictures" supported by CPD values. In this report we describe the discovery of a plasma cell leukemia patient. An anemic sample with high monocyte count (29,13% and 2,94 x $10^3/\mu l$) and no critical leukocytotis (10 x $10^3/\mu l$) was addressed for optical smear review. The VCS scatterplot (VS view) showed the monocyte cluster close to the neutrophil one with a very thin difference between the two population. The CPD values suggested us the presence of hypo-granulated NE and hyper-granulated Monocytic population; in fact Ne mean scatter was 128 (normal value is around 137) and MO mean scatter was 99 (n.v. 86). The VC view showed also that the MO cluster had higher mean C value (131 vs 125) than normals. This data suggested us the presence of abnormal cells similar to monocyte. At the smear review we found several lymphocytes clusters 30% in clones with higher volume, a more condensed chromatin pattern, a lower nuclear-cellular ratio, and an eccentric nucleus.
We decided to deeply investigate this sample with cytofluorimetric analysis with MoAb combination of CD27/CD56/CD45/CD38/CD20 and k/l/CD38/CD19/CD45 and we found a population CD38posCD45negCD19negCD56posCD27negCD20neg restricted for κ light chain.
We finally agreed that this pattern was compatible with the diagnosis of plasmacell leukemia.
In the follow-up of this patient we constantly found non significative differences in the cluster differentiation of VCS scatterplots and CPD parameters, suggesting that this data, in combination with scatterplot interpretation, could be used as a screening tool to validate this kind of morphological abnormalities.

IL RUOLO DEI POLIMORFISMI CYP2C9 E VKORC1 IN UN CASO DI ACCUMULO DI ACENOCUMAROLO

E. Insirello[1], L. Russo[1], V. Scavo[1], A.M. Roccazzello[1], G. Tringali[1]

[1]Istituto Ricerca Medica e Ambientale Acireale

Scopo del lavoro:
E' pervenuto alla nostra osservazione un paziente con stent coronarico in terapia con acenocumarolo (Sintrom da 4 mg.). Fin dall'inizio della terapia aveva mostrato un'esagerata risposta al farmaco con INR variabili da 3.6 a 3.9. Per questo motivo è stato inviato presso l'Istituto dal nosocomio che aveva proceduto ad effettuare l'intervento per consulto di farmacogenetica. In effetti anche con dose molto ridotta (1/4 al giorno per due giorni con un giorno di pausa) l'INR non scendeva oltre 3.6. Si è quindi proceduto ad effettuare i polimorfismi del gene VKORC1 e del CYP2C9, strettamente associati con la risposta alla terapia anticoagulante (Warfarina e Sintrom come in questo caso).
Metodica:
La procedura si articola in tre passaggi: -isolamento del DNA, -amplificazione tramite PCR con primer biotinilati, -ibridazione inversa dei prodotti amplificati. La metodica analizza tre loci polimorfi: VKORC1 -1639 G>A, CYP2C9 430 C>T, CYP2C9 1075 A>C (2C9*3).
Risultati:
L'esame ha mostrato una doppia omozigosità per entrambi i geni (VKORC1 e CYP2C9 430 C>T) caratterizzati da diminuita attività. Si è proceduto quindi a iniziare con Sintrom da 1 mg e nel giro di due settimane dopo alcuni aggiustamenti della posologia l'INR si è stabilizzato a 2.9 – 2.6.
Considerazioni conclusive:
Nello specifico, l'esame di farmacogenetica ha consentito di capire che l'acenocumarolo andava in accumulo facendo elevare di molto l'INR. La farmacogenetica, quindi, rappresenta un'innovazione nella gestione clinica dei soggetti geriatrici in polifarmacoterapia e si dimostra di grande utilità nella valutazione dei soggetti cardiopatici che effettuano terapia con warfarin o acenocumarolo. Inoltre, l'applicazione della farmacogenetica a più ampio spettro ridurrà notevolmente molte reazioni avverse a farmaci non immunomediate consentendo al medico una maggiore tutela del rischio professionale derivante dalla prescrizione terapeutica.
Bibliografia:
Spreafico, Marta; Lodigiani, Corrado; van Leeuwen, Y; Pizzotti, Denise; Rota, Lidia L; Rosendaal, FR; Mannucci, Pier M; Peyvandi, Flora. Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. Pharmacogenomics, Volume 9, Number 9, September 2008 , pp. 1237-1250(14).

STUDIO DELLA METODICA dHPLC PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI DEI GENI BRCA1 E BRCA2

M. Andolina[1], A. Tiralongo[1], E. Insirello [1], A.M. Roccazzello[1], G. Tringali[1]
[1]*Istituto Ricerca Medica e Ambientale - Acireale*

Obiettivi: Per l'identificazione delle mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2 (tumori eredo-familiari inerenti il carcinoma ereditario alla mammella HBC o Hereditary Breast Cancer, prostata e colon), il sequenziamento diretto costituirebbe la tecnica ottimale per rilevare il più alto numero di mutazioni. L'elevata dimensione di entrambi i geni e la differente tipologia di mutazioni rende tale metodica inapplicabile a scopi diagnostici routinari. A tale scopo sono presenti, in letteratura, applicazioni di differenti metodiche impiegate con sequenzialità per un pre-screening cui seguono eventuali ulteriori laboriosi approfondimenti.
Metodologia: Un metodo di pre-screening per le mutazioni BRCA1 e BRCA2 è la dHPLC. Si tratta di una cromatografia ionica in fase inversa che sfrutta, in condizioni di parziale denaturazione, la diversa ritenzione delle molecole di DNA in assenza/presenza di variazioni di sequenza. Maggiore è la lunghezza del frammento da analizzare, maggiore sarà la forza con cui questo viene assorbito dalla fase stazionaria. I campioni da esaminare vengono amplificati mediante PCR e successivamente denaturati e lentamente rinaturati in modo da formare gli eteroduplex in caso di mutazione.
Risultati: La dHPLC è una tecnica molto sensibile per lo screening di mutazioni puntiformi (95%-97%) e può essere applicata a frammenti di DNA con dimensioni comprese fra 100 e 700 bp. Tale metodica è applicabile a scopi diagnostici routinari per l'identificazione delle mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2 nonostante l'elevata dimensione di entrambi i geni e la differente tipologia di mutazioni.
Considerazioni conclusive: Il principale vantaggio della dHPLC è quello di essere totalmente automatizzabile: inoltre è una tecnica rapida e poco laboriosa, in quanto non richiede attività addizionali rispetto alla comune amplificazione del DNA mediante PCR. La dHPLC è un metodo di rilevamento indiretto cui deve seguire una caratterizzazione definitiva con metodo diretto (direct DNA Sequencing).
Bibliografia: Mario Budroni, Rosaria Cesaraccio, Vincenzo Coviello, Ornelia Sechi, Daniela Pirino, Antonio Cossu, Francesco Tanda, Marina Pisano, Grazia Palomba, and Giuseppe Palmieri. Role of BRCA2 mutation status on overall survival among breast cancer patients from Sardinia. BMC Cancer. 2009; 9: 62.

HOMOCYSTEINE AND S-ADENOSYLATED METABOLITES IN CARDIOVASCULAR DISEASE

M.C. Gueli[1], E. Vinciguerra[2], E. Guglielmini[3]
[1]*Dip. Scienze Biochimiche, Università di Palermo*
[2]*Azienda U.S.L. Palermo*
[3]*Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Legale, Università di Palermo*

A major unanswered question is whether direct cellular toxicity of homocysteine (Hcy) is causally involved in cardiovascular disease (CVD) in humans or whether homocysteinemia is simply a passive and indirect indicator of a more complex mechanism. Alternatively or additionally, the association between Hcy and CVD may result from its metabolic precursor S-adenosyl-Hcy (SAH), or from the altered ratio of S-adenosylmethionine SAM/SAH. This competition is based on the known effects of these adenosylated metabolites on cellular methylation, disturbances of which may lead to endothelial dysfunction and/ or CVD. Thus, it is of great significance to know how these adenosylated metabolites (SAM, SAH) and Hcy are interrelated, and how they relate to CVD. We measured SAM, SAH, their molar ratio, and tHcy in plasma and in red blood cells (RBCs) of 30 patients with proven CVD (age 64.2 ± 8.4) and 29 healthy controls (age 61 ± 7.5). Plasma and RBCs SAM, SAH and tHcy levels were measured by HPLC method.
We soon confirmed a significant increased of plasma levels of tHcy, SAM, and SAH in patients compared to the controls (13.1 vs. 10.9 micromol/l; 134 vs. 62.0 nmol/l; 79.2 vs. 24.0 nmol/l, respectively), while the molar ratio of SAM/SAH was decreased in patients (1.69 vs. 2.58). In RBCs patients exhibited increased levels of SAH compared with controls (325 vs. 201 nmol/l) whereas SAM (3327 vs. 3635 nmol/l) and the molar ratio of SAM/SAH (10.2 vs. 18.0) were significantly decreased. Folic acid and vitamin B12 in plasma were similar in patients and controls. We suppose that what we noticed might be due to the lack of remethylation in RBCs additionally to the inhibition of transmethylation reactions by elevation of SAH. Since the ratio of SAM/SAH is strongly linked with the activity of numerous enzymatic methylation reactions, these results suggest that methylation may be impaired in these patients. This increased intracellular SAH, when occurs in endothelial cells, would lead to excessive endothelial apoptosis, which is both pro-atherogenic and pro-thrombotic. Together, these results point out the importance of remethylation pathway in CVD. Gueli et al. 2000 IBST 15:167.

PRELIMINARY STUDY ON T LYMPHOCYTES ROLE IN DELAYED ADVERSE DRUG REACTION (ADR) TO NSAID

M. Caruso[1], P.L.M. Di Giuseppe[1], A.R. Pennisi[1], A.M. Fisichella[1], G. Tringali[1]

[1]*Sezione di Citofluorimetria ed Immunoematologia, Istituto Ricerca Medica ed Ambientale (I.R.M.A.) di Acireale*

Introduction
T cells play a key role on allergic reaction. In particular CD4 cells recognize antigens exposed on APC and activate themselves in TH2 manner producing a range of signals (cytokines, receptors, etc.) that stimulate IgE production and inflammatory cells activation, (e.g. eosinophils and basophils). The aim of this study is to assess the activation of T cells in TH2 way, after stimulation with the drug molecules which the patient reports delayed-type ADR.
Materials and Methods
Peripheral whole blood from 3 subjects reporting delayed ADR to ASA and/or PAR, and a healthy subject was collected. WBC were purified, resuspended in a calcium enriched buffer and then stimulated respectively with PBS (negative control), PHA-L (positive control), ASA and PAR at 37°C for 24 hours. After incubation the surnatant from each tube was recovered and assayed for cytokines IL-1 #, IL-2, IL-4. IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, TNFß and IFNγ by flow cytometry.
Results
Cytokines that have shown a significant trend on allergic subjects compared to healthy controls were IL-4, IL-5 (TH2) and IL-6 (TH1). On samples from allergic subjects stimulated by drugs we observed an increase vs baseline control in IL-4 (P<0,5) and IL-5 (P<0,2 and P<0,5), but not on healthy subject. Also on the subject that reported only ASA hypersensitivity, the expression of these cytokines increased only by the stimulus with ASA. Instead IL-6 increase in healthy subject and decrease in sensitized subjects.
Conclusions
This preliminary study suggests that the determination of Th1/Th2 cytokines could represent a viable approach to study the delayed type ADR. IL-4 and IL-5 showed a trend that well correlates with other studies that had already indicated these cytokines as potential markers of T helper cytoreactivity on allergic reactions. The increase of IL-5 could explain the boost of eosinophils in the circulation and in tissues during allergic reaction. Since the decrease in allergic subjects, and the increase in healthy subject stimulated with ASA or PAR, IL-6 seems to have a protective effect against allergic reactions. In light of these results, the cytokines IL-4 and IL-5 could be considered as significant markers for the study of delayed-type ADRs that cannot be diagnosed at present by conventional methods.

ANALISI DELLO STATO MUTAZIONALE DI KRAS NEI CARCINOMI DEL COLON-RETTO: NOSTRA ESPERIENZA

R. Costanzo[1], M.R. Pulvirenti[1], D. Alosi[1], S. Barbuscia[1], G. Ferlito[1], L. Memeo[1]

[1]*Servizio di Anatomia Patologica, Istituto Oncologico del Mediterraneo, Viagrande (CT).*

La terapia con anticorpi monoclonali (Cetuximab e Panitumumab) diretti contro l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ha dimostrato un miglioramento della sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma del colon-retto (CCR) metastatico. Tale terapia richiede l'analisi mutazionale dell'oncogene KRAS, che codifica per una proteina coinvolta nella via di trasduzione del segnale intracellulare mediato dal recettore stesso. Quando il gene KRAS è mutato, la proteina è espressa costituzionalmente, in conformazione attiva anche in assenza del segnale indotto dagli specifici ligandi dell'EGFR per cui l'inibizione del recettore mediante gli anticorpi monoclonali non ha alcun effetto. L'utilizzo di tali anticorpi monocanali è stato quindi approvato solo in pazienti con KRAS wild type.
Sono stati selezionati per l'analisi mutazionale di KRAS 186 pazienti affetti da CCR operati presso il nostro Istituto. Sezioni di tessuto FFPE contenenti almeno il 70% di cellule neoplastiche senza aree di necrosi, reazione desmoplastica o intenso infiltrato infiammatorio sono state valutate dopo colorazione in ematossilina/eosina ed utilizzate per l'estrazione del DNA. La qualità del DNA genomico estratto è stata validata mediante Multiplex PCR sui geni housekeeping TBXAS, RAG1, PLZF, AF4 (Van Dongen JJM et al, Leukemia 2003) i cui risultati sono stati apprezzati mediante elettroforesi microcapillare su Agilent 2100 Bioanalyzer. IL DNA genomico è stato amplificato mediante PCR utilizzando primers specifici per i codoni 12 (GGT) e 13 (GGC) dell'Esone 2 di KRAS. I prodotti di PCR sono stati sequenziati con sequenziatore monocapillare ABI PRISM 310.
Le mutazioni sui codoni 12 e 13 dell'Esone 2 di KRAS sono state riscontrate in 49 dei 186 casi esaminati (26.3 %). Di questi, 39 (79,6 %) presentano mutazione sul codone 12 (19: G12D; 12: G12V; 4: G12S; 2: G12A; 2: G12C) e 10 (20,4 %) sul codone 13 (sempre G13D).
Conoscere lo stato mutazionale di KRAS consente di individualizzare la terapia in quanto solo pazienti affetti da CCR metastatico KRAS wild-type beneficiano del trattamento con Cetuximab o Panitumumab.

CD69 AND IL-5 ON TH CELLS AS IN VITRO MARKER FOR DELAYED ADVERSE DRUG REACTION (ADR) TO BETA-LACTAMS

M. Caruso[1], P.L.M. Di Giuseppe[1], A.R. Pennisi[1], E. Scalia[1], G. Tringali[2]

[1]*Sezione di Citofluorimetria ed Immunoematologia, Istituto Ricerca Medica ed Ambientale (IRMA) di Acireale (Catania)*

[2]*Istituto Ricerca Medica ed Ambientale (IRMA) di Acireale (Catania)*

TH2 activation of T lymphocytes on delayed ADR is a well-known event[1].It would be extremely useful to identify markers that can accurately assess the specific activation of T lymphocytes from subjects who report this type of reaction.In previous studies we evaluated only the production of extracellular cytokine on the blood of subjects who reported delayed ADR to NSAIDs evidencing significant increases in IL-4 and IL-5 on hypersensitive subjects.In this study we correlate the TH2 cytokines,both extracellular and intracellular,on subjects who reported ADRs to ß-lactam and an early marker of activated T helper cells (CD69)[2].

Peripheral blood was collected from 6 hypersensitive subjects to ß-lactams and 6 healthy controls,the WBCs were purified,and resuspended with Ca enriched buffer.Cells suspensions were divided into two series of tubes(1 and 2) and to the series 2 was added Brefeldin A.Both sets of samples were then stimulated with PBS, PHA-L, Penicillin G, major (MDM) and minor penicillin determinants (PPL),Amoxicillin,Ampicillin,Cephalosporin C,Cefamandole,Cefazolin and Cefuroxime.Samples were incubated for 16 hours at 37°C.From the samples of series 1 the supernatant was collected and marked to evaluate cytokines in suspension by flow cytometry,while from the samples of series 2 cells were collected,washed,fixed,permeabilized and labeled with CD4, CD69, IL-4 and/or IL-5,and then read by flow cytometry. The results were expressed as Stimulation Index(SI),the ratio between the stimulated cells and the Negative Control(NC). SI≥2 was considered as positive result.

Results obtained shown a good correlation between CD69 and both intracellular and extracellular IL-5,but not with IL-4.Normal controls no evidence any increment both in cytokines and CD69 except for one case.These results allow us to hypothesize that IL-5 and CD69 seem to be the most reliable markers for delayed ADR,also for the rarely false positive results,but still needs further studies, especially in order to expand casuistry.

1. Maggi E. The TH1/TH2 paradigm in allergy. Immunotechnology. 1998 Jan;3(4):233-44

2. A. Beeler, W. J. Pichler et al. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. Allergy. 2008 Feb; 63(2): 181-188.

PARAMETRI MAF E RSF IN PAZIENTI CON BETA TALASSEMIA ETEROZIGOTE (DATI PRELIMINARI)

P. De Luca [1], M. Restuccia[1], O.C. Fogliani[1], S. Messina[1], G. Randazzo Papa[1]

[1]*UOC Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero G. Fogliani, Milazzo*

Introduzione: La definizione di uno stato carenziale di ferro è particolarmente importante nell'accertamento dei soggetti con stato di ß-Talassemia eterozigote (vedi Decreto Assseesorato Sanità Regione Sicilia del 12/08/97).

Scopo del lavoro: Con questo studio preliminare abbiamo iniziato a valutare l'ambito d'utilizzo dei parametri eritrocitari e reticolocitari MAF (Microcytic Anemia Factor) e RSF (Red Size Factor), forniti dallo strumento Coulter LH780, nella verifica di un eventuale stato di carenza marziale nei soggetti con ß-Talassemia eterozigote.

Materiali e metodi: Abbiamo analizzato (Coulter LH780) 68 pazienti con ß-Talassemia eterozigote, suddividendoli in 2 gruppi: soggetti con normale assetto marziale (ßTal) e soggetti con deficit marziale (ßTalDM); come criterio discriminante abbiamo utilizzato: % Saturazione Transferrina < 20% e Ferritina < 100 ngr/mL.

Per l'elaborazione statistica ci siamo avvalsi del software MEDCALC.

RISULTATI: i parametri più significativi derivanti dal nostro studio sono stati i seguenti:

ßTal media (SD); RBC 5,68 (0,58); Hb 12,04 (1,20); MCV 67,2 (3,9) MAF 8,09 (1,02); RSF 80,83 (4,64); ßTalDM media (SD);RBC 5,31 (0,46); Hb 10,88 (0,97); MCV 64,8 (3,2) MAF 7,06 (0,81); RSF 77,73(3,42). Si evidenziano differenze significative nei parametri MAF (p< 0,0001) e RSF (p= 0,0026) tra i 2 gruppi in oggetto.

Discussione: La differenza nei valori medi per i parametri MAF e RSF suggerisce la possibilità di utilizzarli nella valutazione dello stato marziale dei soggetti con β-Talassemia eterozigote e/o nella identificazione dello stesso specie se in forma latente. Le analisi delle curve ROC individuano per il MAF un cut-off di 7,2 (sensibilità 58,8; specificità 78,8; AUC 0,754) e per il RSF un cut-off di 80,01 (sensibilità 76,5; specificità 58,8; AUC 0,694).

Bibliografia: E. URRECHAGA (2008) Clinical utility if new beckman-coulter parameter red blood cell size factor in the study of ß-Talassemia eterozigote.

AMATO; FUSCO e ALTERINI (2008) Nuovi parametri eritrocitari e reticolocitari nel monitoraggio della terapia con agenti stimolanti la eritropoiesi.

RELATIONSHIP BETWEEN FETUIN A AND KIDNEY FUNCTION DECLINES IN ELDERLY

C. Bellia[1], G. Bivona [1], C. Carru[3], A. Zinellu[3], R. Tomaiuolo [2], A. Ruocco [2], G. Castaldo[2], M. Ciaccio[1], L. Deiana[3]

[1]*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

[2]*CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia; Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, Italia*

[3]*Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari, Italia*

Aim: Several evidences have linked the decline in kidney function, frequent in elderly, with cardiovascular disease (CVD). Fetuin-A is a circulating inhibitor of ectopic calcification in vivo; it is decreased in patients with chronic kidney disease and correlates with cystatin C, a serum marker of glomerular filtration rate, in patients with coronary artery disease. Moreover, some data suggest a role for Fetuin A in the atherosclerotic plaque calcification, frequently observed in ESRD subjects. However, the association between kidney function decline and Fetuin A has not been described in elderly. Aim of the study was to evaluate cystatin C and fetuin A serum levels together with AHSG T256S genotype in a population of healthy elderly.
Methods: Serum cystatin C levels were determined by latex particle-enhanced immunonephelometry (Dade Behring). Serum fetuin-A levels were determined by an ELISA method (Epitope Diagnostics). T256S polymorphism of AHSG gene was determined by PCR-RFLP using SacI. Statistical analysis was performed with the SPSS software.
Results: our study population was composed by 206 healthy individuals with a mean age of 93,7 ± 6,9 years, with 65% female. The mean value of cystatin C was 1,4 ± 0,6 mg/l, while fetuin-A serum levels were 0,38 ± 0,13 g/l. Moreover, subjects with at least one S allele had lower fetuin-A levels (P<001). Interestingly, fetuin-A was associated with increasing age (r=0.159; p=0.027; adjusted for sex), such as cystatin C (r=0.359; p<0.001; adjusted for sex), while no significant association was found between fetuin-A and cystatin C (Beta di Pearson: 0.17; p=0.815).
Discussion: the increase in cystatin C serum levels observed is in agreement with a decline in kidney function also in centenarians. Also fetuin-A decreases with age, although no relationship with kidney function decline was founded. Our results confirm T256S polymorphism as a genetic determinant of plasma fetuin-A levels.
Reference: Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG, et al. Fetuin A and kidney function in persons with coronary artery disease – data from the Heart and Soul Study. Neprol Dial Transplant 2006; 21: 2144-41.

FREQUENCIES OF PAI-1 4G/5G POLYMORPHISM IN ELDERLY

A. Caruso[1], C. Bellia[1], C. Carru[3], A. Zinellu[3], R. Tomaiuolo [2], A. Ruocco [2], G. Castaldo[2], M. Ciaccio[1], L. Deiana[3]

[1]*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

[2]*CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia; Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, Italia*

[3]*Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari, Italia*

Aim: the incidence of venous thrombosis (VT) increased nearly exponentially with age. Etiology, diagnosis, prognosis and therapy may all be different in the elderly compared with young or middleaged adults. One of the most important key genes for aging-associated thrombosis is plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a principal inhibitor of fibrinolysis. The 4G allele is associated with elevated levels of circulating PAI-1 and it is even more frequent in centenarians than in young individuals. It is intriguing that genotypes associated with "high-risk" phenotypes are at least as frequent or even more frequent in centenarians than in young individuals who carry a lifelong risk of atherothrombotic disease. This paradoxical finding is not isolated, because other genotypes with potentially unfavorable cardiovascular effects have been found more frequently in centenarians. The purpose of our study is to observe the genotype frequencies of 4G/5G PAI-1 in a group of centenarian subjects.
Methods: participants were genotyped for the 4G/5G polymorphism by PCR-RFLP analysis with BslI restriction enzyme, as described elsewhere.
Results: our study population was composed by 123 healthy individuals with a mean age of 93,7 ± 6,9 years, with 41% male. In this study group we found the following genotype frequencies: 23% 5G/5G, 49% 4G/5G, and 28% 4G/4G.
Conclusions: our results show a high frequency of the 4G/4G and 4G/5G genotype among the centenarians studied, in agreement with data in literature. These data are consistent with genotype frequencies observed in general population. Data about the haemostasis profile of centenarians once again emphasized the need for a multidisciplinary approach if we wish to understand the mechanisms of successful aging and to establish the contribution of unknown protective genes.
Reference: Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Doggen JM. Venous thrombosis in elderly. J Thromb Haemost 2007; 5: 310-317.

CSF HOMOCYSTEINE LEVELS AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

G. Bivona[2], F. Valentino[1], C. Bellia[2], B. Lo Sasso[2], V. La Bella[1], M. Ciaccio[2]

[1]*Centro Regionale di Riferimento SLA, Dipartimento di Neuroscienze Cliniche*

[2]*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Aim: Homocysteine (HC) is implicated in the metabolism of important pathways in the brain. A number of studies have suggested that HC might be implicated in the pathogenesis of certain neurodegenerative disorders, as this amino acid has been reported to be increased in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with Alzheimer's and Parkinson's disease. Serum HC is also increased in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Aim of the present study was to assay HC in the CSF of ALS patients and disease controls, and evaluate its relationship with clinical ALS variables and the rate of progression of the disease.
Patients: 36 ALS patients (M/F 1.4; mean age at onset, 64.1 + 10.9 years; 11 with bulbar onset, 30%) who met the revised El-Escorial criteria for clinically definite, probable or probable with laboratory support ALS were selected. Disease controls were patients admitted in our Hospital for suspected (not confirmed) neurological disorders, e.g. multiple sclerosis, subarachnoid haemorrhage, myelitis and polyneuropathy. CSF from ALS patients and disease controls was obtained as a necessary step of the diagnostic workup and all patients gave an informed consent to the procedure.
Methods: CSF was obtained from fasted patients between 9:00 and 10:00 AM after overnight bed-rest. The CSF was rapidly frozen and stored at -80°C until use. HC level in CSF was assayed using a high performance liquid chromatograph (HPLC) and fluorimetric detection (excitation and emission # were set at 335 and 455 nm).
Results: The mean level of free HC in the CSF of ALS patients was found to be 0.48 + 0.19 #mol/L, slightly lower from that of the controls (0.56 + 0.12 #mol/L, - 14.2%, p = ns). CSF HC in ALS was nor related to the severity of the disease (as measured as a rate of progression with the clinimetric Appel ALS rating scale and ALSFRS-R), age at onset, diagnostic delay, and site of onset.
Conclusion: CSF HC concentration is not a biochemical marker of ALS and is probably unrelated to the pathophysiology of the disease.
Reference: Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P, et al. Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 2008; 70:222-225.