

2° Evento Nazionale Congiunto SIBioC-SIMeL

**41° Congresso Nazionale della Società Italiana di  
Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)**

Napoli, 27-30 ottobre 2009

***Riassunti Poster***

<b>Codice Poster</b>	<b>Argomento</b>
• 001 - 003	Analisi decentrate
• 004	Applicazioni informatiche
• 005 - 014	Automazione e gestione del laboratorio
• 015 - 045	Biologia molecolare
• 046 - 058	Coagulazione
• 059 - 068	Controllo e gestione della qualità
• 069 - 077	Diabete
• 078 - 114	Ematologia
• 115 - 121	Endocrinologia
• 122 - 144	Farmacologia e tossicologia
• 145 - 158	Immunologia, autoimmunità
• 159 - 165	Immunometria
• 166 - 172	Lipidi e lipoproteine
• 173 - 196	Marcatori cardiaci
• 197 - 214	Marcatori di neoplasia
• 215 - 219	Medicina e sport
• 220 - 243	Proteine ed enzimi
• 244 - 258	Studi clinici
• 259 - 284	Valutazione di strumenti e prodotti
• 285 - 300	Varie

---

*Nota dell'Editore:*

*i riassunti sono stati riprodotti senza alcuna revisione editoriale dal materiale direttamente fornito dagli autori.*



001

**VALUTAZIONE COMPARATIVA DI DIFFERENTI METODICHE DELLA PCR AD ALTA SENSIBILITA' DOSATA NEL POCT ED IN LABORATORIO**

L. Loiodice<sup>1</sup>, L. Varraso<sup>1</sup>, V. Ruggeri<sup>1</sup>, M. Tampoia<sup>1</sup>, S. Lapolla<sup>1</sup>, A. Colacicco<sup>1</sup>, A. Verna<sup>1</sup>, S. Marsico<sup>1</sup>, F. Di Serio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Patologia Clinica I, Azienda Ospedaliera Universitaria Consorziale Policlinico, Bari

Introduzione. La PCR ad alta sensibilità (hs) è una proteina della fase acuta che ha un alto valore predittivo indipendente di rischio coronarico e vascolare, cardiaco e periferico.

Scopo del lavoro. Comparare tre metodologie per il dosaggio della PCRhs in pazienti selezionati, eseguito sia in struttura con POCT (Cardiologia d'emergenza) che in laboratorio.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati 69 pazienti affetti da angina pectoris, 37 M e 32 F, età media 65aa (range 50–80). La PCRhs è stata dosata mediante immunodosaggio a partizione radiale (Acute Care CardioPhase hsCRP) su StratusCS (Siemens) nel POCT, in immunoturbidimetria (RCRP) su RXLDimension (Siemens) ed in immunonefelometria (CardioPhase hsCRP) su BN2 (Siemens) in laboratorio. Per tutte le metodiche sono stati utilizzati i parametri analitici ed i controlli di qualità interni della ditta Siemens. L'imprecisione è stata valutata mediante il CV % intraserie. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software Analysis.it.

Risultati. La concentrazione media dei valori ottenuti è stata: 100.77 (DS 126.56) mg/l su Stratus, 131.34 (DS 275.92) mg/l su RXL, 108.90 (DS 210.54) mg/l su BN2. Il t test ha rilevato differenze statisticamente significative nella comparazione dei dati ottenuti con strumentazione BN2 sia con i risultati riscontrati su RXL ( $p=0,016$ ) sia con quelli su Stratus ( $p<0,01$ ). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra RXL e Stratus ( $p>0,1$ ). Secondo la comparazione di Passing & Bablok la Pendenza e l'Intercetta sono state rispettivamente 1,25 e 0,03 per la hsCRP (BN2 # RXL); 0,84 e -0,07 per l'hsCRP (Stratus # BN2); 0,95 e 0,06 per la CRPP (RXL # Stratus). Il valore della r di Pearson è stato di 0,98 tra BN2 e RXL; 0,87 tra BN2 e Stratus; 0,80 tra RXL e Stratus.

Discussione e conclusioni. La valutazione comparativa tra le metodiche utilizzate per il dosaggio della hsCRP ha evidenziato una buona correlazione alle basse concentrazioni di proteina. I coefficienti di Pearson consentono una valutazione statistica del rischio cardiovascolare tra i diversi metodi, ma dimostrano che non è possibile l'interscambio delle metodologie nella diagnostica e nel monitoraggio dei pazienti, che deve essere effettuato sempre con un unico metodo.

002

**POCT: ERROR TRACKING IN THE POST-ANALYTICAL PHASE**

M. Petronelli<sup>1</sup>, I. Specchia<sup>1</sup>, L. Varraso<sup>1</sup>, G. Amodio<sup>2</sup>, F. Di Serio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Pat. Clinica I, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico, Bari

<sup>2</sup>U.O. Cardiologia di Emergenza, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico, Bari

Background. Following NACB, CLSI, ISO guidelines, two POCT cardiac markers are implemented in emergency cardiology department (ECD) and in intensive cardiology unit (ICU). We improved the accuracy of the patient/specimen identification by assuring connectivity between POCT devices and LIS. In analytical phase, the quality of results is ensured through the internal quality control and external quality assessment programs. POCT have been accredited by the Clinical Pathology Accreditation (CPA) and certified according to ISO 9001:2000.

Aim. Evaluate the frequency and types of errors in the post-analytical phase.

Materials and Methods. POCT reports were monitored through 2008; in ECD and in ICU, among a total of 27.918 and 7.830 reports respectively, 810 (3%) and 1.350 (17.2%) results were missed. After discussing with the clinical staff about the possible sources of errors, four main errors were identified and four error codes created. All clinicians were encouraged to put into the LIS patient record the appropriate error code if the result of the test was not available.

Results. During the first 6 months of 2009, the following types of errors were identified: "analyser error" (ECD=12%; ICU=41%), "over linearity range" (ECD=7%; ICU=15%), "not performed analysis" (ECD=65%; ICU=42%), "not performed monitoring" (ECD=16%; ICU=1.7%). In ICU the analyser has been replaced and the program for the planned maintenance has been improved. In many cases the note "not performed analysis" referred to the myoglobin: the clinicians realized that only the troponin is the marker for the cardiac damage according to its specificity and sensitivity. Therefore the code test related to the myoglobin was removed from the admission profile. In ICU a new training program for the clinical staff is started to properly perform the dilution procedures. In ECD, the monitoring of troponin was not performed when the first troponin measurement was above the decisional limits.

Conclusions. A systematical approach to point out errors even during post-analytical phase has allowed to better understand the root causes and undertake the corrective measures. All the information are filled in the patient file.

Reference

Plebani M, Clin Chim Acta 2009;404:59-64.

003

**VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE DELLE STRISCE URINARIE A LETTURA OTTICA AUTION STICK 10A (Menarini) NELLO SCREENING PER LE INFEZIONI DEL TRATTO URINARIO (ITU) E PROTEINURIA**

T. Rubeca<sup>1</sup>, S. Rapi<sup>2</sup>, L. Bartolini<sup>3</sup>, C. Tozzetti<sup>4</sup>, C. Bazzini<sup>4</sup>, P.A. Modesti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>U.O. Lab. Citologia Analitica e Biomolecolare, Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica (ISPO), Firenze

<sup>2</sup>Lab. Generale, Dip. Diagnostica di Laboratorio AOU Careggi, Firenze

<sup>3</sup>Lab. Microbiologia, Dip. Diagnostica di Laboratorio AOU Careggi, Firenze

<sup>4</sup>Clinica Medica e Cardiologia, Dip. Area Critica Medico Chirurgica, Università Studi Firenze

Le strisce reattive con lettura strumentale rappresentano uno dei principali strumenti diagnostici per lo studio dei campioni urinari, in grado di fornire informazioni utili sia nella diagnostica che nell'inquadramento delle patologie urinarie (1). Scopo del presente studio è stata la valutazione della capacità delle strisce multiparametriche a lettura ottica (Aution Stick 10A, Menarini) di discriminare pazienti con infezioni del tratto urinario (ITU) e di individuare livelli significativi di proteine urinarie (Pt) Le valutazioni sono state condotte su campioni presentati al laboratorio per gli specifici approfondimenti diagnostici analizzati con le strisce immediatamente dopo le indagini richieste.

Una valutazione preliminare della variabilità legata alla lettura ottica è stata effettuata analizzando le risposte di 3 operatori nella valutazione delle Pt su 80 campioni Lo Z test applicato alle differenze di lettura registrate ha mostrato una buona concordanza fra le risposte ( $p < 0.01$ )

L'accuratezza diagnostica per ITU (colonie  $> 10^5$ ) è stata studiata su 179 pazienti presentati con richiesta di esame culturale considerando pH, Pt, globuli rossi, Leucociti (L), Nitriti (N) I parametri significativi sono stati selezionati mediante regressione logistica multivariata che ha indicato L e N come parametri significativi. I parametri ottenuti per la curva ROC sono stati: AUC=83%, sens=72%, spec=85%. Le capacità delle strisce di predire livelli significativi di Pt è stata studiata su 280 campioni. rispetto ai valori di proteinuria determinata con metodo colorimetrico su ADVIA 2004 (Siemens Health Care Diagnostic

I parametri ottenuti costruendo la curve ROC rispetto al limite decisionale riportato nel referto ( $Pt > 150\text{mg}/24\text{h}$ ) risultano: AUC=88% sens=93% spec=73%

Le strisce a lettura ottica possono ancora rivelarsi preziose nelle situazioni in cui la rapidità delle risposte diventa determinante ed in tutti i casi in cui la raccolta e l'invio del materiale si rivelino problematici come in campo pediatrico e nello screening nei paesi logisticamente svantaggiati soprattutto considerando che la conservazione e l'invio dei materiali possono avere comunque notevoli ripercussioni sulla qualità delle risposte ottenute

**Bibliografia**

1. Clinical Chemistry 48: 2236-41;2002.

004

**INTEGRAZIONE D'APPLICAZIONI MSACCESS IN UNA PIATTAFORMA PER IL SISTEMA QUALITA'**

M. Nundini<sup>1</sup>, M. Nicoli<sup>1</sup>, M.S. Graziani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche O.C.M. Azienda Ospedaliera di Verona

**Obiettivi.** Quale naturale evoluzione dello sviluppo di applicazioni, basate su MSAccess®, per la gestione di documenti del Sistema Qualità del laboratorio, si è pensato di progettare e realizzare un sistema integrato che riunisse, semplificasse e rendesse più razionale il loro utilizzo. A tale scopo è stata sviluppata una interazione definita Piattaforma Integrata del Sistema Qualità. Residente su server aziendale essa consente oggi di accedere ad un'unica banca dati condivisa, in grado di supportare l'intero menù di applicazioni al momento disponibili, da qualsiasi computer della rete aziendale attraverso autenticazione.

**Metodologia.** Analizzando l'attuale regime di utilizzo delle esistenti applicazioni (gestione delle Schede Analisi e dei documenti ad esse correlati, gestione delle specifiche analisi e dei documenti del Sistema Qualità) si è proceduto ad elaborare adeguate procedure che ne migliorassero l'attività in vista di un'integrazione, risolvendo tutte le problematiche relative ad un'aumentata multiutenza. Si è poi proceduto allo sviluppo di un menù piattaforma che rendesse selezionabile l'intero ventaglio d'applicazioni e dei manuali pdf delle stesse. Per semplificare l'utilizzo sono state posizionate, sui desktop delle postazioni d'uso abituali, icone con collegamento diretto all'applicazione.

**Risultati.** La possibilità di accedere da un unico punto a tutte le applicazioni MSAccess® relative al Sistema Qualità ha ampliato il range dell'utenza, spingendo alcuni settori del laboratorio a proporre miglioramenti ed evoluzioni. Ha integrato nell'utilizzo, per le specifiche competenze, l'area di segreteria ed ha fornito al responsabile del Sistema Qualità un efficace strumento di controllo e di verifica delle informazioni.

**Conclusioni.** La realizzazione di una piattaforma in grado di legare a se le applicazioni, basate su MSAccess® per la gestione razionale e dinamica di documenti legati al Sistema Qualità del laboratorio, ha messo in luce come le competenze informatiche, unite a quelle laboratoristiche, possano dare vita ad efficaci strumenti software di facile impiego, dai costi più che contenuti ed esenti dalle classiche ridondanze dei pacchetti generalisti offerti dal mercato.

005

**CLINICAL LABORATORY MANAGEMENT THROUGH REORGANIZATION: ASUR ZT2 (REGIONAL PUBLIC SANITARY SERVICE TERRITORIAL AREA 2) MARCHE ITALIAN REGION EXPERIENCE**

E. Pazzaglia<sup>1</sup>, C. Di Pietro<sup>1</sup>, G. Bianchi<sup>1</sup>, P. Mezzolani<sup>1</sup>, O. Stocchi<sup>1</sup>, D. Vandini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analysis Operative Urbino Hospital

Background. Urbino Province has 44959 inhabitants (I), served by 3 hospitals: Urbino (Uh 43415 I, 183 beds), Cagli (Ch, 20022 I, 46 beds) and Sassocorvaro (Sh, 20622 I, 42 beds). Volume activity in 2008 was 1329470 tests, and daily job is on 3 shifts to cover 24 hours. In 2004, 3 laboratories performed 72100 immunoassay (IA) tests with different instruments coming from different old tenders and dedicated human resources (HR); at least 2 tubes with-drawer per patient. Test assaying and reporting was postponed to the day after. Preanalytical management was manual. In Uh laboratory, biochemistry tender was already closed, assessing 1 Vitros 950 and 1 Fusion 5.1 (Ortho CD). New tender for IA was performed, consolidating all IA test and equipping preanalytical automation in Uh, maintaining cardiac markers (CM) in 3 laboratories. Beckman Coulter won with Power Processor linked to 1 UniCel DxI800 in Uh and 1 Access for CM in both Ch and Sh.

Aim of the Study. Verify with objective parameter reorganization success.

Methods. HR and costs analysis.

Results. 2008 IA tests performed: Urbino 116000, Cagli 2300, Sassocorvaro 2900. IA systems pre-tender/post tender: from 7 to 3.

Technicians HR pre-tender/post-tender (due to retiring): Urbino 10/9, Cagli 4/3, Sassocorvaro 5/4. After reorganization, all technicians are able to manage Power Processor and both biochemistry and IA instruments; daily, one doctor and one or two technicians manage Uh corelab. In Uh, IA tests growth from 2004 to 2008 is about 63% and is performed with less HR (no more dedicated) and less instruments.

3 old tender IA costs have allowed Power Processor acquirement in new IA tender without incremental costs.

Conclusion. Consolidation process and automation equipment is a good way to manage HR reduction due to retiring unreplacement. Go from different instruments to unique family systems with same reagents across different laboratories simplify routine life and reduce costs. Modern laboratory equipment can adsorb incremental job without problems.

References

Italian Government Financial Law 2004, article30th.

006

**IL MONITORAGGIO DELL'EFFICIENZA DEI SISTEMI AD ALTA AUTOMAZIONE**

S. Mercurio<sup>1</sup>, S. Rapi<sup>1</sup>, L. Serpi<sup>1</sup>, B. Salvadori<sup>1</sup>, B. Sisi<sup>1</sup>, P. Pezzati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Generale, Dip. Diagnostica di Lab. AOU Careggi, Firenze

I sistemi ad alta automazione applicati alla diagnostica di laboratorio sono un tentativo per conciliare efficienza ed efficacia delle prestazioni creando macro-aree di lavoro ad alta complessità organizzativa e gestionale (1). Il Laboratorio dell'AOU Careggi è dotato di un sistema, Labcell (Siemens Health Care Diagnostics) che forma un'isola di alta automazione (CoreLab) destinata a gestire 56 analiti (immunometria e chimica clinica) per un totale di ~6 milioni di test/anno. La gestione del Corelab è agevolata da un middleware (Centralink) che provvede al dialogo col LIS ed alle funzioni gestionali di controllo qualità e risultati analitici.

Nella nostra esperienza si è resa necessaria la definizione e la registrazione di una serie di indicatori quali: turnaround time (TAT); capacità produttiva (registrazione dei referti conclusi in un intervallo di tempo standard); ore di effettiva disponibilità degli strumenti; numero di provette non gestite dal sistema; numero e durata degli interventi tecnici straordinari; ore per manutenzioni programmate ed attività gestionali. Queste informazioni, benché residenti sul middleware, non risultano facilmente reperibili e richiedono un notevole investimento di energie per la loro registrazione. Il TAT viene seguito ricavando le informazioni dal LIS, gli altri parametri sono registrati su moduli cartacei dedicati. E' quindi necessario il trasferimento ed l'elaborazione periodica dei dati. Le statistiche ottenute sono impiegate per l'analisi delle criticità del settore, delle azioni correttive, come feedback per Siemens e per la verifica dell'effettiva capacità produttiva. Ad esempio, ponendo come target la chiusura entro le 14 di un numero di campioni #85%, si è potuto osservare che esso viene raggiunto nel 36.5% delle giornate di lavoro (ggl) (in dettaglio: vengono conclusi il 90% dei campioni nel 17.4% delle ggl; tra 80-90% dei campioni nel 47.8% delle ggl, <80% nel 34.8% delle ggl). Queste informazioni vanno ad integrare i dati di performance analitica, costituendo così un insieme di evidenze per la valutazione di efficienza del sistema. L'avvento di middleware che consentano un effettivo monitoraggio degli indicatori è altamente auspicabile.

Bibliografia

1. Rodney S.M. Clin. Chem. 46:5 764-71 (2000).

007

**PREANALYTIC PHASE: INTRODUCTION OF AN AUTOMATED SYSTEM TO REDUCE ERROR IN LABORATORY**

T. Di Matola<sup>1</sup>, S. Esposito<sup>1</sup>, A. Scappi<sup>2</sup>, P. Ricchi<sup>3</sup>, G. Somma<sup>1</sup>, M.P. Salvi<sup>1</sup>, G. Cinquegrana<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, F. Ingala<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica, CTO, Napoli

<sup>2</sup>Becton Dickinson, Milano

<sup>3</sup>U.O.C. Microcitemia, Antonio Cardarelli, Napoli

The Medical Laboratory Services are high technological complexity areas; therefore it is necessary to define procedures of clinical risk management, aiming at reducing the occurrence of incidents and at actively monitoring the appearance of sentinel events.

Bearing in mind that laboratory automation allows an accurate process of control of analytic and postanalytic phase, our working experience indicated that the greatest number of sentinel events happened during the preanalytic phase.

In the last six months, we found the following sentinel events:

- 4 incorrect identifications of the patient;
- 1 incorrect labelling of the primary test-tube;
- 1 incorrect acceptance from homonymy;
- 1 incorrect labelling of the secondary test-tube.

Clinical risk is defined as the probability that a patient has to suffer from an adverse event. One of the greatest problem we currently faced was the extreme difficulty to identify all laboratory errors since many of them do not produce anomalous results able to make suspicious clinical pathologist and/or final customer.

ISO 15189:2003 specifies requirements for preanalytic phase, quality and competence particular to medical laboratories.

In our laboratory we are planning to introduce an automated identification system of the preanalytic phase with the purpose to diminish the incidence of errors and to predispose corrective preventive actions in order to reduce eventual damages to the patient.

The adoption of such System would concur to correctly identify all patients, along the whole iter of the diagnostic process, by means of portable organaizers, barcode bracelets and a dedicated Kit, containing tests-tube with the same one barcode of the bracelet.

Identification patient's Kit is a innovative technological solution generated to improve effectiveness (error reduction), to increase efficiency (optimization of the use of available resources), to pull down additional costs (not easily assessable) deriving from errors of the process production of the information in Clinical Laboratory and, above all, to guarantee safety and quality of diagnostic performances to patient.

References

1. Lippi G et al. Clin Chem Lab Med, 2009;47(2):143-53.
2. Soderberg J et al. Clin Chem Lab Med, 2009;47(2):195-201.

008

**AUTOMAZIONE IN EMATOLOGIA: UN'OPPORTUNITÀ TECNOLOGICA E PROFESSIONALE**

M. Statello<sup>1</sup>, S. Stefanelli<sup>1</sup>, O. Gioia<sup>1</sup>, R. Barbuti<sup>1</sup>, M. Tonelli<sup>1</sup>, M. Bernini<sup>1</sup>, G. Marrani<sup>1</sup>, S. Sastrucci<sup>1</sup>, R. Gallai<sup>1</sup>, C. Papi<sup>1</sup>, F. Angiolini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Generale, Dip. Diagnostica di Laboratorio AOU Careggi, Firenze

Il cambio strumentale avvenuto dieci anni fa nel settore di ematologia, caratterizzato fino a quel momento da molte procedure manuali, ha prodotto nella nostra realtà lavorativa una trasformazione tale da mettere in discussione la tradizionale figura professionale del tecnico di laboratorio. L'alta automazione ha infatti fornito strumenti tecnologici che hanno permesso al TSLM, grazie anche ad un costante percorso di formazione ed aggiornamento professionale, di passare da un ruolo di passivo spettatore o "preparatore del lavoro", ad attivo protagonista dell'intero processo analitico. Nella nostra realtà il flusso medio giornaliero di emocromi è di circa 1000 campioni eseguiti dal sistema integrato Sysmex HST DASIT® gestito dal SIS (Sysmex Information System), middleware che oltre a ricevere la programmazione del lavoro, consente una prima valutazione dei dati strumentali sulla base di valori di normalità, di panico, allarmi analitici, morfologici, anagrafici, patologia, reparto di provenienza e precedenti dati archiviati. Sono stati inoltre impostati criteri di reflex testing per l'esecuzione automatica di test aggiuntivi o per la preparazione del vetrino ematologico. Ciò comporta il rilascio automatico dei dati o il blocco delle analisi per ulteriore approfondimento. Il TSLM, dopo aver valutato le informazioni provenienti dal sistema, dati numerici, curve di distribuzione, citogrammi e allarmi strumentali, programma interventi mirati. La validazione tecnica può portare al rilascio dei risultati o alla valutazione morfologica dello striscio ematico per la validazione clinica. Con l'introduzione dell'alta automazione, le competenze acquisite dal personale tecnico sono andate evolvendosi, dando risalto ad una professione che nel corso degli anni ha implementato le proprie conoscenze attraverso sia la formazione universitaria sia l'aggiornamento continuo. La nostra decennale esperienza ci consente di affermare che l'alta automazione, contrariamene ai timori iniziali, non soltanto ha permesso di migliorare la qualità del dato di laboratorio, ma ha anche indirizzato la professione del tecnico verso nuove competenze e nuove capacità di elevata specialità, avviando così un processo di riqualificazione professionale e gratificazione personale.

009

### AUTOMATIZATION OF GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE DETERMINATION

G.L. Salvagno<sup>1</sup>, G. Lippi<sup>1</sup>, M. Gelati<sup>1</sup>, F. Bellorio<sup>1</sup>, V. Vandelli<sup>1</sup>, M. Montagnana<sup>1</sup>, C. Brentegani<sup>1</sup>, O. Ruzzenente<sup>1</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Verona, Italy

**Background.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a cytosolic enzyme in the pentose phosphate pathway, a metabolic pathway that supplies reducing energy to cells by maintaining the level of the co-enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Since G6PD deficiency, an X-linked recessive hereditary disease characterized by abnormally low levels of the enzyme, is very common worldwide and might cause acute hemolytic anemia in association with some foods and medications, the automatization of this determination is advisable to cope with the growing requests, especially in developing countries.

**Materials and Methods.** The conventional assay for manual determination of G6PD and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) (a two-phase enzymatic reaction, the former transforming glucose-6-phosphate with NADP<sup>+</sup> and G6PD into 6-phosphogluconate and NADPH and H<sup>+</sup> and the latter transforming 6-phosphogluconate and NADP<sup>+</sup> and 6-phosphogluconate dehydrogenase into Ribulose-5-P and nADPH+H<sup>+</sup> and CO<sub>2</sub>) was adapted to be routinely used on a Roche Cobas Mira. After sample extraction, all assay steps were automated, including reagent addition, incubation and data collection.

**Results.** The intra-assay imprecision (coefficient of variation, n=10) of the automated assay for both G6PD and 6PGD had remarkably better analytical performance than that of the manual assay (G6PD: 0.8% vs 5.1%; 6PGD: 1.2% vs 7.3%, respectively). The correlation with the manual assay (n=166) was excellent, being:  $y = 0.87x + 2.03$  (r=0.90; p<0.001) for G6PD, and  $y = 0.55x + 0.95$  (r=0.86; p<0.001) for 6PGD, respectively. The overall bias between assay as estimated by Bland-Altman plots analysis was satisfactory (-8%). Sensitivity and specificity of both assays, as compared with the reference manual assays, were 100%.

**Conclusion.** The automatization of the manual assays for G6PD and 6PGD not only provides improved analytical performances over the traditional (and reference) manual assay, but it is also allows faster processing of the samples and a much higher throughput.

#### Reference

1. Perona G, Guidi GC, Tummarello D, et al. A new glucose 6-phosphate dehydrogenase variant (G-6-PD Verona) in a patient with myelodysplastic syndrome. *Scand J Haematol* 1983;30:407-14.

010

### L'AUTOMAZIONE DI LABORATORIO AL SERVIZIO DEL TURN AROUND TIME

D. Alessio<sup>1</sup>, C.A. Ferrero<sup>1</sup>, M. Pontillo<sup>1</sup>, F. Ceriotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboraf, Dip. di Medicina di Lab., Osp. San Raffaele, Milano

**Introduzione.** Al fine di migliorare il servizio sia per il paziente in termini di riduzione tempi di produzione referto sia per il compartimento medico permettendo un più tempestivo intervento clinico, il Laboratorio Analisi del San Raffaele di Milano ha intrapreso dal 2004 ad oggi un percorso di riorganizzazione strutturale delle attività lavorative sfruttando una serie di tecnologie automatizzate.

**Materiali e Metodi.** Il trasporto dei campioni intra struttura ospedaliera, avviene tramite un sistema di posta pneumatica con 58 stazioni di spedizione. Un dispositivo di sorting e check-in introdotto in Accettazione Campioni gestisce rapidamente le provette suddividendole per le diverse aree di lavoro.

Per quanto riguarda l'area siero, un sistema di automazione aperto ha permesso di consolidare diverse aree analitiche su analizzatori di vari produttori. I parametri analizzati sono 130: chimica clinica, immunochimica, virologia, sierologia ed ormoni fragili.

Il processo, completamente automatizzato, prevede la fase di check-in, centrifugazione, stappatura, seduta analitica, ritappatura, stoccaggio e gestione automatica dei reagenti tramite desigillatore in linea.

Il turn around time (T.A.T.) è stato calcolato dal check-in in laboratorio al momento del rilascio del risultato visualizzabile dal reparto.

**Risultati.** Quotidianamente sono processate da 2.500 a 3.000 provette per una media di 12.300 test/die.

La mediana del T.A.T. (mese di marzo) è stata di 1h e 44 min, di cui 41 min trascorsi dall'arrivo della provetta in laboratorio alla presa in carico sul sistema di automazione, 51 min è il tempo impiegato per la gestione della provetta dal check-in dell'automazione alla ricezione dei risultati mentre 7 min utilizzati per la validazione tecnica del dato clinico.

L'80% delle provette è completato entro 3h dall'arrivo in laboratorio, mentre il 95% entro le 4h.

Nel mese di maggio la mediana del T.A.T. è di 1h e 41 min, entro le 3h sono state completate l'88%, entro le 4h il 91.3%.

**Conclusioni.** Sebbene i risultati ottenuti permettano di gestire i campioni di routine in modo abbastanza rapido, uno dei prossimi obiettivi sarà quello di ridurre ulteriormente il tempo tra check-in ed esecuzione delle analisi.

011

**DEFINIZIONE DI PROCEDURE OPERATIVE NEI SETTORI ANALITICI AD ALTA COMPLESSITA' ORGANIZZATIVA**

P. Pezzati<sup>1</sup>, S. Rapi<sup>1</sup>, S. Mercurio<sup>1</sup>, B. Salvadori<sup>1</sup>, L. Serpi<sup>1</sup>, O. Gioia<sup>1</sup>, B. Sisi<sup>1</sup>, G. Messeri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Generale, Dip. Diagnostica di Laboratorio, AOU Careggi, Firenze

Il settore Corelab del Laboratorio Generale della AOU Careggi (Firenze) è dotato dal 2006 di un sistema ad alta automazione Labcell (Siemens Healthcare Diagnostics) che gestisce un volume di attività pari a 6x10<sup>6</sup> tests/anno. L'efficienza di un sistema di tale complessità è influenzata dalla capacità di standardizzare i processi attraverso l'implementazione di procedure operative altamente condivise (1). La strategia da noi adottata per raggiungere questo obiettivo ha visto la realizzazione di un percorso formativo basato sul metodo del processo decisionale consensuale. Si tratta di un processo decisionale di gruppo, che ha come scopo quello di giungere ad una decisione comune, che non sia solo l'espressione dell'accordo tra la maggioranza dei partecipanti, ma che integri nella decisione anche le obiezioni della minoranza. Il corso, seguito dal 75% dei soggetti a cui era indirizzato, è stato strutturato nel seguente modo: sono state individuate a priori le criticità; sulla base della discussione sono state elaborate le proposte di soluzione; è stato verificato il consenso di ogni membro del gruppo; le eventuali obiezioni sono state identificate e definite; infine le proposte sono state modificate, riformulate o riscritte nel tentativo di affrontare le obiezioni, con ripetizione del processo di consenso fino ad identificare una decisione soddisfacente. Il materiale prodotto è stato integrato con le procedure operative, in particolare sono stati redatti: scaletta oraria per le attività gestionali sulle 24 ore; piano di programmazione per le manutenzioni ordinarie; pianificazione della tempistica per l'analisi di alcune tipologie di controllo di qualità. E' stato inoltre individuato un pannello di indicatori di applicazione delle procedure concordate, da rilevare per un periodo consecutivo di tre mesi (luglio agosto settembre). L'elaborazione in itinere degli indicatori (15/08/2009) ha rilevato un'aderenza alle procedure pari mediamente al 70%, dato che indica una discreta attenzione alla standardizzazione delle operazioni e all'uniformità dei comportamenti, tuttavia si individuano ancora aree che necessitano ulteriori interventi.

**Bibliografia**

1. Bossuyt X et al. Clinica Chemistry 2007;53:10.

012

**INNOVAZIONE TECNOLOGICA IN LABORATORIO: L'ESPERIENZA DELLA PATOLOGIA CLINICA DELL'ISTITUTO NAZIONALE TUMORI REGINA ELENA DI ROMA**

F. De Bellis<sup>1</sup>, B. Frollano<sup>1</sup>, C. Lattanzio<sup>1</sup>, L.

Autullo<sup>1</sup>, M. Attanasio<sup>1</sup>, C. Perfetto<sup>1</sup>, S. Paolangelì<sup>1</sup>, R. Fontinovo<sup>1</sup>, G. Vercillo<sup>1</sup>, G. Cigliana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. Patologia Clinica, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, Roma

Introduzione. Nel corso del 2007-8 è stata effettuata gara pubblica congiunta per l'innovazione tecnologica dei laboratori dell'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena e dell'Istituto Dermatologico S.Maria e S.Galliciano. La ditta ROCHE DIAGNOSTICS ha installato presso il laboratorio della Patologia Clinica un sistema integrato (Modular Pre Analytical, MPA) per la gestione della fase preanalitica in cui il software operativo permette la tracciabilità di tutti i campioni biologici in ogni fase del processo. MPA gestisce l'esecuzione online dei parametri di chimica clinica (C501) ed immunometria (E601) inviando automaticamente i campioni in cassetta alle 2 piattaforme analitiche dell'area sieri composte entrambe da 3 moduli analitici (CEE e CEE). I campioni offline plasmatici vengono centrifugati (ACU) e smistati (PSS) mentre quelli sierici vengono centrifugati, aliquotati in provetta (AQN), etichettati (BCL), tappati (RSP) e smistati (FSS) alle diverse aree analitiche dei due laboratori.

Scopo. Analizzare il flusso lavorativo pre e post innovazione tecnologica per valutare l'effettiva ottimizzazione delle risorse umane e tecnologiche e l'attesa riduzione dell'errore umano e del rischio biologico per gli operatori. Risultati. Per un pannello di circa 350 analiti vengono attualmente prelevate circa 2000 provette fra sangue intero, plasma e siero. La riduzione delle provette totali è stata di circa il 30% mentre è stata di circa il 60% sulle provette dell'area sieri. Con l'innovazione tecnologica e la gestione automatizzata della fase pre-analitica per i 250 parametri offline è stata ottenuta la centralizzazione e ottimizzazione della gestione dei campioni afferenti alle diverse aree analitiche dei due laboratori e l'ottimizzazione del personale dedicato allo smistamento delle provette secondarie. Inoltre è stata raggiunta una riduzione del TAT (<60 min) grazie alla gestione online dei rimanenti 100 parametri (routine e urgenza) per chimica ed immunochimica. Infine è stato registrato un significativo miglioramento relativo alla sicurezza e alla standardizzazione della fase preanalitica con riduzione delle non conformità registrate e con la totale tracciabilità dei campioni, dei materiali e degli eventi.

013

**STABILITÀ DI ANALITI NEI SISTEMI DI AUTOMAZIONE TOTALE (TLA): CHIMICA CLINICA – DATI PRELIMINARI**

C. Laube<sup>1</sup>, M. Demi<sup>1</sup>, A. Leoni<sup>1</sup>, M. Chelli<sup>1</sup>, E. Cestari<sup>1</sup>, N. Botta<sup>1</sup>, N. Simonini<sup>1</sup>, C. Razzano<sup>1</sup>, D. Mantovani<sup>1</sup>, A. La Gioia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Spedali Riuniti, Livorno

Premessa. Il Laboratorio sta evolvendosi verso sistemi ad automazione completa (TLA, dall'accettazione sino allo stoccaggio postanalitico). Lo stoccaggio riveste molta importanza per eventuali verifiche a posteriori, richieste tardive di esami aggiuntivi, ed anche a scopi legali. In tale fase le condizioni di conservazione del campione (temperatura, luce, evaporazione) possono alterarlo e condurre a risultati errati. La ricerca su PubMed non ha mostrato pubblicazioni sulla conservazione in TLA.

Scopo. Nel nostro laboratorio è presente una TLA di ultima generazione (ACCELERATOR, Abbott) con stoccaggio in condizioni ambientali standardizzate e recupero automatizzati. Scopo del lavoro è verificarne l'affidabilità per le misure ripetute dopo giorni.

Metodi. Sono stati considerati i seguenti analiti: A1GP, Alb, ALP, Amy, ALT, AST, Bil, B2M, C3, C4, Ca, Carb, Cl, Che, CRP, CPK, Chol, HDL, LDL, Creat, Feni, Dig, Fenobarb, Fe, GGT, Glu, IgA, IgG, IgM, K, LDH, Lip. Mg, Na, P, Teofillina, ProTot, Trig, Urea, Uric, Valp. Per ogni analita sono stati selezionati casualmente 20 campioni normali (N0) e 20 patologici (P0) della routine giornaliera. Dopo 7 giorni dalla prima determinazione, ogni campione è stato rianalizzato (N7 e P7). Sulle serie N e P di ogni analita è stata effettuato un test di Student-Bonferroni per dati appaiati. Le differenze significative sono state valutate secondo le linee-guida Sibioc (1), ponendo come target il bias "desiderabile". Per gli analiti non citati nel documento il target è stato arbitrariamente posto al 5%.

Risultati. Il 67% delle serie risulta statisticamente stabile per 7 giorni. L' accettabilità sale all'84% confrontando ogni bias con il suo target. Gli analiti ALP (N), ALT (N), B2M (P), BilT (N), C3 (N P), Cl (P), LDH (N P), K (P), P (N P), ProTot (N) ed Uric (N) sono risultati fuori target

Conclusioni. Nelle nostre condizioni standardizzate di conservazione i campioni sono generalmente rimisurabili entro la settimana. Sono in corso studi per determinare con più precisione il tempo di stabilità, verificare la ripetibilità e quantificare l'entità del bias, chiarire le differenze fra N e P.

**Bibliografia**

1. Linee guida SIBioC sulla gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno – Appendice 2

014

**STABILITÀ DI ANALITI NEI SISTEMI DI AUTOMAZIONE TOTALE (TLA): IMMUNOMETRIA – DATI PRELIMINARI**

C. Laube<sup>1</sup>, M. Giordano<sup>1</sup>, C. Falciani<sup>1</sup>, M. Fiorini<sup>1</sup>, R. Gorini<sup>1</sup>, G. Setzu<sup>1</sup>, G. Pratesi<sup>1</sup>, S. Fedi<sup>1</sup>, S. Vitale<sup>1</sup>, A. La Gioia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Spedali Riuniti, Livorno

Premessa. Il Laboratorio sta evolvendosi verso sistemi ad automazione completa (TLA, dall'accettazione sino allo stoccaggio postanalitico). Lo stoccaggio riveste molta importanza per eventuali verifiche a posteriori, richieste tardive di esami aggiuntivi, ed anche a scopi legali. In tale fase le condizioni di conservazione del campione (temperatura, condizioni di luce, evaporazione) possono alterarlo e condurre a risultati errati. La ricerca su PubMed non ha mostrato pubblicazioni sulla conservazione in TLA.

Scopo. Nel nostro laboratorio è presente una TLA di ultima generazione (ACCELERATOR, Abbott) con stoccaggio in condizioni ambientali standardizzate e recupero automatizzati. Scopo del lavoro è verificarne l'affidabilità per le misure ripetute dopo giorni.

Metodi. Dalla routine giornaliera sono stati selezionati a caso 20 campioni normali (N0) per i seguenti analiti: AntiTPO, AFP, CA125, CA15.3, CA19.9, CEA, Estrad, Ferrit, FSH, Folati, freeT4, LH, Prol., Prog, freePSA, totPSA, PTH, Testost. TSH, vitB12. Negli stessi giorni sono stati selezionati 20 campioni patologici (P0) per i seguenti analiti: AFP, CA125, CA15.3, CA19.9, CEA, Ferritina, freeT4, totPSA, PTH e TSH. Dopo 7 giorni dalla prima misura, ogni campione è stato rianalizzato (N7 e P7). Sulle serie N e P di ogni analita è stata effettuato un test di Student-Bonferroni per dati appaiati. Le differenze significative sono state valutate calcolando il bias percentuale medio e ponendo come target bias il bias "desiderabile" secondo linee guida (1). Per gli analiti non citati nel documento il target è stato arbitrariamente posto al 10%.

Risultati. Solo i PSA N risultano statisticamente instabili dopo 7 giorni. Di questi, solo il freePSA (bias = -23% +/- 9%) risulta anche fuori target (18.7%).

Conclusioni. Nelle nostre condizioni standardizzate di conservazione i campioni sono generalmente rimisurabili entro la settimana. Sono in corso studi per determinare con più precisione il tempo di stabilità, verificare la ripetibilità e quantificare l'entità del bias, chiarire le differenze fra N e P.

**Bibliografia**

1. Linee guida SIBioC sulla gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno – Appendice 2

015

**PREVALENCE OF HLA-B\*5701 IN HIV-INFECTED PATIENTS**

R. Gigli<sup>1</sup>, G. Niro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*U.O.S. Biologia Molecolare, Osp. A. Cardarelli ASREM, Campobasso*

HLA-B\*5701 genotyping appears to be an effective pharmacogenomic test before starting patients on an abacavir-containing regimen, to reduce the risk of hypersensitivity reaction (HSR). Abacavir (ABC), a guanosine reverse-transcriptase inhibitor and an important antiretroviral treatment against infection with the human immunodeficiency virus (HIV), has been used by almost 1 million patients infected with HIV during the past decade. Genetic association of ABC HSR with the presence of HLA-B\*5701 has been demonstrated in an extensive investigation of the MHC in study, showing a prevalence of 5,6% in HIV-infected population. Methods and Results. The investigation of the genotypes HLA-B\*5701 has been done by the nucleic acid amplification of the second to the fourth exon of HLA B locus and melting curve analysis. From January, 2009 to April, 2009 we studied 30 patients admitted to our Molecular Biology Laboratory. Our data showed that the frequency of HLA-B\*5701 was 10% (3 of 30 patients) more prevalent than other works.

References

1. Philips E et al. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:324-30.
2. Mallal et al. *N Engl J Med* 2008;358:568-79.

016

**STUDIO SU PAZIENTI AFFETTI DA DISFUNZIONE ERETTILE: IPEROMOCISTEINEMIA E TIPIZZAZIONE GENEICA**

D. Vannoni<sup>1</sup>, S. Giglioni<sup>2</sup>, C. Francalanci<sup>3</sup>, A.R. Cito<sup>2</sup>, E. Brogi<sup>2</sup>, R. Ponchietti<sup>4</sup>, R. Mattei<sup>3</sup>, R. Leoncini<sup>1</sup>, L. Micheli<sup>2</sup>, E. Aceto<sup>2</sup>, C. Scapellato<sup>1</sup>, R. Pagani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*UOC Lab. di Analisi Cliniche, AOUS Le Scotte, Siena*

<sup>2</sup>*Dip. Med. Interna, Sc. Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Univ. di Siena*

<sup>3</sup>*UOC Dietetica Medica, AOUS Le Scotte, Siena*

<sup>4</sup>*Dip. Ped. Ostetricia e Med. della Riproduzione, Univ. di Siena*

La disfunzione erettile (ED) è una patologia con impatto negativo sulla qualità della vita di milioni di uomini in tutto il mondo. E' noto che l'ossido nitrico (NO), sintetizzato da vari isoenzimi (NO sintasi), svolge un ruolo importante nelle funzioni endoteliali. L'omocisteina, un aminoacido introdotto con l'alimentazione, è un regolatore fondamentale di tali enzimi. E' noto che l'iperomocisteinemia è inclusa tra le cause certe di malattia tromboembolica ed è considerato un fattore di rischio indipendente sia per trombosi venosa che arteriosa e causa di danno endoteliale. Numerosi studi attestano che uomini con diabete di tipo II, pur non presentando alcun sintomo di disturbo cardiovascolare, se affetti da ED, hanno un 58% di possibilità di sviluppare un infarto. Alla luce di tutto ciò, abbiamo voluto valutare, in pazienti affetti da ED sia i livelli ematici di omocisteina, che la possibile presenza di difetti genetici in enzimi coinvolti nel suo metabolismo.

Sono stati analizzati 14 pazienti di età compresa tra i 42-75 anni; oltre ai normali dosaggi ematici di routine che attestavano, nella maggioranza dei casi, la presenza di dislipidemia, iperglicemia o diabete conclamato, abbiamo valutato i livelli di omocisteinemia e cisteinemia con metodica HPLC. La presenza di mutazioni a carico dei geni MTHFR (polimorfismo C677T ed A1298C) e CBS (844INS68) è stata valutata mediante kit AC053 su striscia, NLM s.r.l. (Mi, Italia).

I livelli di omocisteina e cisteina sono risultati significativamente più elevati rispetto ai controlli, rispettivamente con  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ . Il 65% dei casi presentava mutazione C677T, il 79% mutazione A1298C nel gene MTHFR ed il 22% INS68 nel gene CBS.

Questi apprezzabili risultati suggeriscono che l'iperomocisteinemia, già nota come un importante fattore di rischio nella disfunzione endoteliale (1), può avere un ruolo preminente nella ED, ed essere collegata a particolari carenze genetiche dei soggetti affetti da tale patologia.

Bibliografia

1. *Metabolism Clinical and Experimental* 55 (2006) 1564-1568.

017

**DETECTION OF 14 HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES IN CERVICAL SAMPLES IN WOMEN FROM A MIDDLE-SOUTHERN AREA OF ITALY SHOWING DIFFERENT PAP TEST RESULTS**

B. Zappacosta<sup>1</sup>, L. Romano<sup>1</sup>, M. Guerriero<sup>1</sup>, M. Graziano<sup>1</sup>, A. Vitrani<sup>1</sup>, M. De Ninno<sup>1</sup>, A. Carbone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Depa. of Laboratory Medicine and Pathology, Centro di Ricerche e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche "Giovanni Paolo II", Università Cattolica del S. Cuore, Campobasso*

We evaluated the prevalence of human papillomavirus (HPV) infection and correlated the molecular test results with the cytological examination data (PAP test) in 364 women living in middle-southern Italy (Molise region), by means of polymerase chain reaction HPV DNA genotyping and of cervical cytology.

One hundred twenty eight women resulted HPV positive (35.2%), HPV16 being the most frequent genotype. HPV positive women were significantly younger than negative patients (35.9±8.4 years and 38.2±9.1, respectively; p=0.018); women with multiple infections were also significantly younger than those with single infection (31.7±6.9 and 37.6±8.3, respectively; p=0.0002). Moreover, high risk HPV positive patients were significantly younger than low risk HPV positive women (35.1±7.7 and 40.5±10.5, respectively; p=0.008). In the HPV positive group, 14 patients (10.9%) did not show any significant cytological alteration. Conversely, 7 out of 236 HPV negative women (3.0%) showed high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Furthermore, HPV 16 or 18 were present in more than 70% of women positive for HSIL at cytology. Our data suggest the potential effectiveness of combined cytology and molecular test to further study clinical cases with apparently laboratory conflicting results.

018

**DETECTION OF ONCOGENIC HUMAN PAPILLOMA VIRUS: DIFFERENCES BETWEEN PRIMARY AND SECONDARY SCREENING AND METHODOLOGICAL IMPLICATIONS**

Z. Napoli<sup>1</sup>, A. Baroncelli<sup>1</sup>, P. Apicella<sup>1</sup>, A. Papucci<sup>1</sup>, L. Bianchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*U.O. Anatomia Patologica ASL3, Pistoia*

**Introduction.** Several studies support the use of high-risk HPV testing in the management of patients ASCUS and in the follow-up of patients with high-grade cervical dysplasia at the biopsy, but also it can be applied to primary screening.

**Purpose.** In the present study we have evaluated: 1) differences of HPV prevalence between primary screening and women with intraepithelial lesions (secondary screening); 2) correlations between high-risk HPV types and the grade of the lesions; 3) differences of HPV types incidences between the two screenings.

**Methods.** A population of 1140 and 300 women aged 18-70 years (february 200-june 2009), with and without, respectively, cervical intraepithelial lesions such as ASCUS, LSIL and HSIL was investigated by HPV test from cervical smears. For the detection and genotyping of HPV types we used INNO-LIPA Genotyping Extra kit (Innogenetics).

In secondary screening HPV infection was detected in 29,6% of women. HR types were 67,9% (54/80) of ASCUS HPV-positive, 68,5% (155/226) of LSIL HPV-positive and 94% (32/34) of HSIL HPV-positive. The most frequent HR-types were HPV 16 (23,7%) and HPV 31 (16,2%).

**Results.** In primary screening HPV infection was detected in 17,24% (52/300) of women, 83% were HR-HPV and after 18-24 months the 14,5% were negative. Most frequent HR types were HPV 16 (36%), HPV 31 (12%) and HPV 45 (8%). A significant proportion (32%) of HPV (59, 26, 69/71, 53, 66, 51) founded in primary screening were not detected in women with cervical lesions.

**Conclusion.** 1) HR-HPV detection and genotyping allow the selection of patients with higher risk for cervical carcinoma, and it is useful in the triage of patients with ASCUS; 2) The high incidence of HR-HPV types in high-grade cervical lesions makes this test important to improve primary screening efficiency; 3) it remains to be evaluated if one needs to use a primary screening test to detect the largest of viral genotypes or it is sufficient to detect the 13 most frequent HR-genotypes.

**References**

Mayrans MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, et al, Canadian Cervical Screening Trial Study Group (2007). Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 357(16):1579-88.

019

**G6PD NOVEL MUTATION, FAVA BEANS INTAKE AND NEONATE FEMALE BREASTFEEDING: WHEN THE LABORATORY MEDICINE "RUNS AFTER" THE CLINIC**

E. Capoluongo<sup>1</sup>, A. Minucci<sup>1</sup>, P. Concolino<sup>1</sup>, M. Antenucci<sup>1</sup>, B. Giardina<sup>1</sup>, C. Zuppi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Biologia Molecolare Clinica, Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario "A. Gemelli", Roma

**Background.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the most common X-linked hereditary RBC enzyme deficiency. When carriers of mutations, females are generally asymptomatic: this condition may represent a risk factor for their male newborns while more rarely in females for episodic haemolytic crises. The present study reports a case of neonatal hemolytic crisis at etiology difficult to diagnose.

**Methods.** A 1-month-old female newborn was admitted at our Hospital after an episode of lipotimia/fainting. Lab tests showed: bilirubin 3.0 mg/dl; LDH 500 UI/l; Hb 7.0 g/dl; RBC  $3.5 \times 10^{12}/l$ . RMN and neurological examinations resulted negative. The mother was deeply interviewed from the Lab specialist counselor: she referred that the lipotimic event occurred 12-16 hrs after she had eaten a large amount of fava beans and having subsequently breastfed her daughter, also supplementing baby's diet with Vitamin K. Since newborn received a blood transfusion, we performed on the mother the G6PD activity dosage + G6PD/6PGD ratio (which resulted both as normal), followed by genetic screening (detection of the most frequent Italian G6PD mutations).

**Results.** Mother's G6PD/6DPG ratio and activity resulted normal. Since the genetic screening was negative, we sequenced entire G6PD gene that presented a novel missense mutation of G > A at nucleotide 170. The same mutation was found on the DNA from mouth swab of her daughter.

**Discussion.** The present case confirms that G6PD deficiency may be often underestimated in females with hemolytic crisis. Three indicators were important: a) the mother's high intakes of fava beans before breastfeeding, b) the supplementation with Vitamin K, c) lab counseling. Similar clinical cases were very rarely observed, above all in females. The present mutation should be considered as type II WHO classification. We highlight that, in this case, the G6PD/6PGD ratio failed in identifying the heterozygote: thus, we would stress the concept that Lab counseling should be mandatory, having been its role fundamental for the final diagnosis of G6PD-deficiency.

020

**MOLECULAR IDENTIFICATION QUESTIONS IN THE THALASSEMIA DIAGNOSIS**

A. Amato<sup>1</sup>, M.P. Cappabianca<sup>1</sup>, I. Zaghis<sup>1</sup>, D. Ponzini<sup>1</sup>, F. Mastropietro<sup>1</sup>, L. Masi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A.N.M.I. Onlus, Centro Studi Microcitemie, Roma

We report on the case of an Italian woman, who resulted positive for  $\beta$  thalassemia (thal) trait, during a school screening for thal 28 years ago. Since 1972 the Centro Studi Microcitemie Roma applies the protocol for an universal screening of secondary school children in Latium region.

She was examined with her family in 1981 for the first time and today the proband has been re-examined by the use of more up-to-date diagnostic technologies.

Routine hematology; separation of the Hb fractions (HPLC) with measurement of the Hb A<sub>2</sub> and Hb F levels; globin chain synthesis; molecular analysis by ARMS-PCR and direct sequencing.

In 1981 the proband, her mother and brother, were all defined  $\beta$ thal carriers, although with borderline values, while her father resulted to be negative for  $\beta$ thal trait.

After the current re-examination, the proband presented a slight stress of classic  $\beta$ -thal trait: MCV from 75 to 69 fl; MCH from 24.8 to 23.9 pg; as for Hb fractions, it is not possible to make an exact comparison, because in 1981 electrophoresis on cellulose acetate (pH 8.6) was used. The present values are: Hb A<sub>2</sub> 3.9% and Hb F 1.6%, with normal iron metabolism indices.

The globin chain synthesis ratio was 1.43.

ARMS-PCR method did not detect the presence of any common Italian molecular defects, while direct DNA sequencing of the  $\beta$  globin gene pointed out a point mutation, never described before in Italian population, at the poly (A) signal in the 3' UTR RNA cleavage site (AATAAA--AACAAA).

Further molecular investigations did not detect anything additional.

The point mutation at the poly (A) signal is considered as a  $\beta^+$  thal; it has been characterized in US Blacks and also described in association with a  $\beta^0$  thal in Turkish patients, suffering from mild thal major (1).

Its presence in a woman from Central Italy suggests a high danger level also towards mutations that are unexpected in the origin places of the tested patients.

All the more because today, every time a thal suspect exists, it is possible to extend the molecular study to the entire  $\beta$  globin gene by direct sequencing; above all in subjects with  $\beta$ thal carrier partners, being at risk of having children severely affected with  $\beta$ thal.

References

1. Altay C. et al (1991) Hemoglobin, 15(4), 327-330.

021

**VALUTAZIONE DELLO STATO MUTAZIONALE DEL GENE KRAS IN PAZIENTI AFFETTI DA CRC CANDIDATI A TERAPIA CON CETUXIMAB**

I. Maccabruni<sup>1</sup>, M. Piatti<sup>1</sup>, F. Sciarini<sup>1</sup>, S. Signorini<sup>1</sup>, B.E. Leone<sup>3</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio, Desio, MB

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale (DIMS), Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano Bicocca, Monza

<sup>3</sup>Dip. di Scienze Chirurgiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano Bicocca, Monza

Introduzione e scopo del lavoro. KRAS è un oncogene, la cui mutazioni sono particolarmente frequenti in diversi tumori; esse sono state riscontrate in circa il 40% dei carcinomi del colon-retto, dove sono associate alla resistenza a chemioterapici, quali gli inibitori del recettore dell'EGF (ad esempio, l'anticorpo monoclonale Cetuximab). Sono note molte mutazioni a carico di KRAS, ma quelle più frequentemente coinvolte nella resistenza al trattamento con Cetuximab interessano i codoni 12 e 13. I pazienti che presentano mutazioni in questi codoni non rispondono alla terapia. Risulta da ciò evidente la necessità di valutare lo stato mutazionale di KRAS nel tessuto tumorale per avere un'indicazione sull'utilità di intraprendere la terapia con anticorpo monoclonale.

Materiali e Metodi. Lo scopo del lavoro è stata la messa a punto di un metodo di valutazione dello stato mutazionale di KRAS. Il DNA viene estratto da tessuto deparaffinato prelevato da carcinoma infiltrante primitivo del colon retto. La ricerca di una mutazione a livello dell'esone 2 dell'oncogene KRAS prevede una nested PCR e quindi l'uso di due coppie di primers, una per effettuare una first PCR ed una per la nested. L'amplificato ottenuto dalla nested PCR viene purificato mediante eluizione da gel di agarosio utilizzando il kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN), quindi sottoposto a reazione di cycle-sequencing. Il prodotto di tale reazione viene caricato sullo strumento ABI Prism 310 e analizzato mediante i softwares ABI Prism Data Collection e Sequencing Analysis, al fine di identificare eventuali mutazioni presenti a livello dei codoni 12 e 13 del gene KRAS.

Risultati. In presenza di mutazione, in corrispondenza delle rispettive sequenze, si osservano due picchi sovrapposti, che indicano appunto che il DNA genomico a livello dei codoni 12 o 13 (nucleotidi 215-220 della ORF) presenta un polimorfismo; nel caso in cui non vi sia mutazione, si osserva invece un picco unico.

Conclusioni. Il sequenziamento dell'oncogene KRAS permette di conoscere se il soggetto è portatore di una neoplasia negativa per una mutazione nel codone 12 o 13 e quindi di avviarlo alla terapia con Cetuximab.

**Bibliografia**

Karapetis CS et al. N Engl J Med 2008 Oct 23;359(17):1757-65.

022

**VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST DIAGNOSTICO BASATO SULLA PCR PER LO SCREENING E LA TIPIZZAZIONE DI INFEZIONI MALARICHE**

M. Gramegna<sup>1</sup>, A. Moiana<sup>1</sup>, L. Coltella<sup>2</sup>, C. Russo<sup>2</sup>, S. Gatti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sentinel CH SpA, Milano

<sup>2</sup>Unità di Microbiologia, IRCCS Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>3</sup>Lab. di Parassitologia, Servizio di Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Obiettivi. La malaria è una malattia causata dall'infezione di Plasmodium e veicolata dalle punture di zanzare infette. Circa la metà della popolazione mondiale è a rischio di contrarre la malaria e solo nel 2006 sono stati stimati 247 milioni di casi con 881.000 decessi (WHO).

Una rapida ed accurata diagnosi è essenziale per una terapia efficace, in particolare per le infezioni da Plasmodium falciparum che possono avere esito fatale (1).

Nel presente studio sono valutate le prestazioni diagnostiche di un nuovo test basato sulla tecnica della PCR per l'identificazione delle quattro specie che interessano l'uomo. I risultati sono confrontati con quelli ottenuti con l'analisi microscopica, tecnica considerata "gold standard".

Metodi. Sono stati considerati 45 pazienti sospettati di infezione malarica tra i quali immigrati da paesi extra europei e viaggiatori internazionali, adulti e bambini. La diagnosi dei 45 soggetti è riassunta di seguito: 15 positivi per P. falciparum, 4 per P. ovale, 3 per P. vivax, 1 per P. malariae e 22 diagnosticati come negativi. I primers sono stati selezionati nella regione del gene 18S rRNA. Una ulteriore coppia di primers per l'amplificazione di un frammento del gene della Beta Globina umana è stata inserita come controllo interno. Il prodotto di amplificazione per lo screening fornisce una banda compresa tra 226 e 240 base pairs (bp) a seconda della specie. I primers specifici forniscono bande di: 168 bp per P. f., 95 bp per P. v., di 118 bp per P. o. e 106 bp per P. m. La banda corrispondente al gene della Beta Globina umana (268 bp), sempre presente, conferma la correttezza del sistema.

Risultati. I risultati preliminari del nuovo test confermano una specificità e sensibilità pari al 100%. Il sistema consente di diagnosticare anche campioni con livelli di infezione molto bassi. L'uso di primers specie-specifici permette l'identificazione delle quattro specie in perfetto accordo con la microscopia.

**Bibliografia**

1. Ann Trop Med Parasitol. 2007 Apr;101(3):195-204.

A comparison of three diagnostic techniques for malaria: a rapid diagnostic test (NOW Malaria), PCR and microscopy Gatti S, Gramegna M, Bisoffi Z, Raglio A, Gulletta M, Klerisy C, Bruno A, Maserati R, Madama S, Scaglia M; Gispi Study Group.

023

**ANALISI DELLA CORRELAZIONE TRA PROPORZIONE DI ALLELI JAK2 V617F E FENOTIPO CLINICO IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE**

C. Parma<sup>1</sup>, F. Sciarini<sup>1</sup>, F.M. Biella<sup>1</sup>, A. Cappellani<sup>1</sup>, M. Piatti<sup>1</sup>, G. Limonta<sup>1</sup>, R. Calori<sup>2</sup>, D. Perego<sup>2</sup>, S. Signorini<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Desio e Vimercate

<sup>2</sup>Divisione di Medicina, Azienda Ospedaliera di Desio e Vimercate

<sup>3</sup>DIMS, Dip. di Medicina Sperimentale, Università degli studi di Milano, Bicocca

**Introduzione.** La mutazione JAK2 V617F è presente nel 95% dei casi di policitemia vera (PV), nel 50% dei casi di trombocitemia essenziale (TE) e di mielofibrosi idiopatica (MI). L'ipotesi del dosaggio genico è stata proposta per interpretare la correlazione tra la proporzione di alleli V617F ed i differenti fenotipi clinici. Infatti, una bassa proporzione di alleli mutato si riscontra nelle TE, mentre nelle PV e nelle MI la percentuale di V617F può raggiungere anche il 100%. Inoltre, la presenza della mutazione nei pazienti con TE sembra essere correlata ad una maggiore età alla diagnosi, una conta leucocitaria ed un livello emoglobinico più elevati ed una conta piastrinica diminuita.

**Scopo.** Analisi della correlazione tra proporzione di alleli JAK2 V617F e fenotipo clinico.

**Materiali e Metodi.** Sono stati studiati 64 pazienti in cura presso le Divisioni di Medicina della nostra azienda ospedaliera. La mutazione JAK2 V617F è stata ricercata mediante RT-PCR semiquantitativa (kit Experteam; ABI PRISM 7900 HT, Applied Biosystems).

**Risultati.** Dei 28 pazienti con diagnosi di PV, il 14% risulta non mutato mentre il 29% mostra una proporzione di alleli V617F compresa tra 5-25%, il 18% tra 25-50%, il 21% tra 50-75% ed il 18% tra 75-100%. Il 65% dei 26 pazienti con diagnosi di TE non presenta la mutazione mentre il restante 35% ha una proporzione di alleli mutati compresa tra il 5 e il 25%. Infine, dei 10 pazienti con diagnosi di MI il 40% non ha la mutazione, mentre il 30% ha una proporzione di alleli mutati tra 5-25%, il 10% tra 25-50%, il 10% tra 50-75% e il 10% tra 75-100%. Tra i pazienti TE con e senza mutazione le variazioni dei parametri di laboratorio non sono risultate statisticamente significative.

**Conclusioni.** Nei casi analizzati è confermata la correlazione tra il fenotipo clinico e la percentuale di alleli mutati. Infatti ad una percentuale di V617F maggiore del 50% è sempre associata una diagnosi di PV o MI, mentre nei casi di TE V617F-positivi la percentuale di alleli mutati è sempre inferiore o uguale al 25%. La numerosità dei soggetti affetti da TE non ha permesso di confermare le variazioni dei parametri di laboratorio tra pazienti V617F positivi e negativi.

**Bibliografia**

Passamonti F. *Haematologica* 2009;94:7-10.

024

**EMOCROMATOSI EREDITARIA: APPLICAZIONE DI UN TEST MOLECOLARE**

R. Gigli<sup>1</sup>, G. Niro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S. *Biologia Molecolare Osp. A. Cardarelli ASREM, Campobasso*

L'emocromatosi è una malattia ereditaria geneticamente e clinicamente molto eterogenea caratterizzata dallo sviluppo di un progressivo accumulo di ferro nell'organismo. La disponibilità di tests molecolari da utilizzare in combinazione con indici biochimici quali saturazione della transferrina e ferritina sierica rende possibile la diagnosi di questa malattia in una fase molto precoce, ancor prima che si instauri una sintomatologia. Nel nostro laboratorio viene eseguita l'analisi molecolare di 12 mutazioni del gene HFE, 4 mutazioni del gene TFR2 e 2 mutazioni del gene FPN1 tramite una PCR Reverse Dot Blot (Nuclear Laser Medicine). I campioni sottoposti al test molecolare appartengono a pazienti in regime di ricovero o utenti esterni con sospetto di malattia, legami di parentela con soggetti portatori di emocromatosi. I campioni arrivano in laboratorio corredati di una apposita scheda paziente dove vengono raccolti oltre ai dati anagrafici, i dati clinici e gli indici biochimici di laboratorio. Nei casi da noi esaminati dal 2004 abbiamo riscontrato una frequenza relativa delle mutazioni per il gene HFE del 46,30%, dove la mutazione H63D in eterozigoti è la più rappresentativa (34,57%). Le doppie eterozigoti e le omozigoti, rispettivamente del 3,71% e del 2,47%, anche nel nostro studio sono quelle che hanno una maggiore associazione con alterazione degli indici biochimici, con un maggior rischio di insorgenza della malattia. In un caso la doppia eterozigosi presentava un'associazione C282Y/S65C. Nella nostra popolazione la frequenza allelica della C282Y (8,65%) è più bassa rispetto alla H63D (41,36%) in accordo con altri studi che vedono la C282Y meno rappresentata al sud rispetto all'area geografica del nord.

**Bibliografia**

1. Floreali et al. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Aug 15;26(4):577-586.

2. Candore et al. *Bloods Cells Mol Dis* 2002 Nov-Dec;29(3):267-73.

025

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

A. Caruso<sup>1</sup>, C. Bellia<sup>1</sup>, C. Carru<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>2</sup>, R. Tomaiuolo<sup>3</sup>, A. Ruocco<sup>3</sup>, G. Castaldo<sup>3</sup>, M. Ciaccio<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

<sup>2</sup>*Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>3</sup>*CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia, Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli*

**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.

**References**

1. Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Doggen JM. Venous thrombosis in elderly. *J Thromb Haemost* 2007;5:310-317.

026

**FREQUENZA DELLE MUTAZIONI CFTR IN MOLISE**

R. Gigli<sup>1</sup>, G. Niro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*U.O.S. Biologia Molecolare, Osp. A. Cardarelli ASREM, Campobasso*

Il gene CFTR è costituito da 27 esoni, che si estende nel genoma umano per circa 250.000 paia di basi. L'RNA messaggero corrispondente è espresso nei tessuti epiteliali secernenti di vari organi, tra cui le vie aeree, il pancreas, il fegato, l'intestino, il testicolo, le ghiandole sudoripare e le ghiandole salivari. Nel nostro laboratorio abbiamo analizzato da gennaio 2006 a luglio 2009 624 campioni rappresentati da soggetti con problemi di fertilità, familiarità per fibrosi cistica e pazienti con pancreatici croniche o acute ricorrenti. Allo scopo abbiamo utilizzato una tecnica di PCR-Reverse Dot Blot (Nuclear Laser Medicine) in grado di identificare 36 tra le principali mutazioni del gene CFTR oltre lo studio del polimorfismo del locus "Tn" dell'IVS 8 (sequenza poli-T), con il raggiungimento di una detection rate del 76%. Inoltre per casi selezionati si è proceduto alla ricerca delle principali delezioni CFTR (Ex 2 del, Ex 1 in del, 22 23 24 del, 22 23 del, 2 3 del, 17a 17b 18 del) con PCR-Reverse Dot Blot (Nuclear Laser Medicine). Dei casi esaminati (624) 37 presentavano mutazioni allo stato eterozigote con una frequenza del 5,93%, così distribuite: 22 DF508 (3,23%), 4 R347P (0,64%), 4 N1303K (0,64%), 3 D1152H (0,48%), 1 T338I (0,16%), 1 G85E (0,16%), 1 711+1G>T (0,16%); 1 1717-1G>A (0,16%). Il polimorfismo dell'introne 8 mostrava una frequenza allelica 9T dell'11,78%, 7T dell'81,97% e 5T del 6,25%. Non è stata evidenziata nessuna doppia eterozigoti e l'analisi delle macrodelezioni ha dato esito negativo in tutti i casi selezionati. La sequenza poli-T è stata trovata in omozigosi 5T/5T in ben 11 casi, di cui 2 presentavano un quadro clinico di fibrosi cistica atipica dove è stato necessario un approfondimento dell'analisi molecolare tramite sequenziamento eseguito presso un centro ad alta specializzazione. Nel gruppo costituito da soggetti con problemi di fertilità 2 coppie presentavano entrambi i partners portatori di mutazione per CFTR.

**Bibliografia**

1. Bobadilla JL, et al. *Hum Mutat* 2002;19:575-606.

027

### GENETIC DETERMINANTS OF RESPONSE TO WARFARIN

R. Rolla<sup>1</sup>, S. Meola<sup>1</sup>, P. Pollarolo<sup>1</sup>, M. Vidali<sup>1</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

**Background.** Rapidly determining the appropriate dosage of Warfarin is critical in reducing the risk of life-threatening bleeding and thromboembolic events. It has been shown that genetic variants of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) affect warfarin daily dose maintenance. In this work we used a new microarray technology to evaluate the influence of CYP2C9 and VKORC1 on the stable therapeutic dose of warfarin in an Italian cohort of patients.

**Methods.** 70 patients (M 49%, F 51%) on long-term therapy with a stable dose of warfarin (target INR 2-3) were retrospectively analyzed for genotype variants of CYP2C9 (\*1, \*2 or \*3) and VKORC1 SNP 3673 (-1639G>A) by INFINITI(TM) Warfarin assay which utilizes AutoGenomics proprietary film-based microarray technology.

**Results.** The frequencies of the CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 alleles were 0.17 (95%CI 0.12-0.24) and 0.09 (95%CI 0.06-0.15). With regard to the VKORC1 -1639G>A substitution, we detected 31 (46%; GG), 20 (29%) heterozygous variant (GA) and 18 (26%) homozygous variant (AA) individuals with a -1639G and -1639A allele frequency respectively of 0.60 (95%CI 0.52-0.68) and 0.40 (95%CI 0.32-0.48), in accordance with previous reports in white populations. Carriers of 2C9\*2 and/or \*3 allele (n=29) required a significantly lower warfarin daily dose than patients (n=41) with \*1/\*1 (median 1.8 mg (IQR 1.3-2.2) vs 6.1 mg (IQR 1.8-7.5); p=0.002). Warfarin daily maintenance dose was also significantly different (p<0.001) between patients carrying 1 or both VKORC1 A alleles (n=38) than patients (n=32) with VKORC1 GG genotype (median 1.8 mg (IQR 1.3-2.1) vs 6.8 mg (6.1-8.3)). VKORC1 and CYP2C9 genotypes were associated with warfarin dose even after taking into account the effect of age and no interaction was observed between CYP2C9 and VKORC1 alleles.

**Conclusions.** Responses to warfarin anticoagulation therapy of the patients investigated are associated with both CYP2C9 and VKORC1 gene variants.

#### Reference

1. Zhu Y. et al. Estimation of Warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. Clin Chem 2007; 53(7):1199-1205.

028

### IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI MUTAZIONI NEL GENE LDLR IN PAZIENTI DEL SUD ITALIA AFFETTI DA IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

M.N. D'Agostino<sup>1</sup>, M. Romano<sup>1</sup>, M.D. Di Taranto<sup>2</sup>, G. Marotta<sup>3</sup>, M. Gentile<sup>3</sup>, G. Abate<sup>1</sup>, R. Di Noto<sup>1</sup>, L. Del Vecchio<sup>1</sup>, P. Rubba<sup>3</sup>, G. Fortunato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia e Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

<sup>2</sup>Fondazione IRCCS SDN, Napoli, Italia

<sup>3</sup>Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Introduzione.** Le Ipercolesterolemie familiari autosomiche dominanti sono dovute a difetti nel gene del recettore delle LDL (LDLR), del suo ligando Apolipoproteina B-100 o a mutazioni che determinano un aumento di funzione nel gene della Proproteina Convertasi Subtilisina Kexina. Mutazioni nel gene LDLR costituiscono le cause principali di Ipercolesterolemia Familiare (FH) (1).

**Materiali e Metodi.** Sono stati reclutati 56 pazienti del Sud Italia con diagnosi clinica di FH. E' stata effettuata la ricerca di mutazioni nel gene LDLR mediante sequenziamento diretto della regione del promotore, della regione codificante e delle porzioni introniche coinvolte nei meccanismi di splicing. Nei casi con sospetto clinico di FH ed assenza di mutazioni puntiformi è stata effettuata l'analisi mediante la metodica della Multiplex Ligation-Probe Dependent Amplification (MLPA), che permette di quantizzare il numero di copie di ciascuno dei 18 esoni e del promotore del gene LDLR e individuare grandi delezioni o duplicazioni nel gene LDLR. L'analisi funzionale è stata effettuata quantizzando al citofluorimetro il legame e l'internalizzazione di LDL fluorescenti su linfociti B immortalizzati di soggetti portatori delle mutazioni.

**Risultati.** Mediante sequenziamento diretto sono state identificate mutazioni in 40/56 pazienti (frequenza di mutazione 71,4%) di cui 5 nuove mutazioni, assenti in 150 cromosomi di soggetti normali. La metodica MLPA ha permesso di rilevare grandi delezioni in 3/16 pazienti (frequenza di mutazione totale 76,8%). Tre delle nuove mutazioni causano la sostituzione di residui aminoacidici conservati tra le specie, mentre le altre due causano uno stop prematuro nella sintesi della proteina. La caratterizzazione funzionale ha evidenziato una riduzione nel legame e nell'internalizzazione delle LDL fluorescenti nelle linee linfoblastoidi con le nuove mutazioni, dimostrandone il ruolo causativo.

**Conclusioni.** I risultati ampliano lo spettro di mutazioni nel gene LDLR nel Sud Italia e mostrano che le nuove mutazioni determinano una sostanziale riduzione dell'attività del LDLR. Inoltre, l'utilizzo della MLPA per la ricerca di grandi delezioni è altamente consigliata nella diagnosi genetica di FH.

#### Bibliografia

1. Varret M et al. Clin Genet 2008;73:1-13.

029

**MBL GENIC VARIANTS: AN ADVANTAGE OR A DISVANTAGE FOR LONGEVITY?**

R. Tomaiuolo<sup>1</sup>, A. Ruocco<sup>1</sup>, C. Carru<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>2</sup>, C. Bellia<sup>3</sup>, G. Bivona<sup>3</sup>, M. Ciaccio<sup>3</sup>, G. Castaldo<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Naples, Italy

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Italia

<sup>3</sup>Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy

MBL2 is a triple helical protein produced by liver and secreted in blood where it forms polymers that bind bacteria and: i) activate the lectin-complement pathway; ii) promote opsonophagocytosis; iii) induce IL-8. Three variants in exon 1 (R52C, G54D e G57E) impair the polymerization of the protein and strongly reduce its activity. Three mutations within promoter (-550G>C; -221G>C; +4C>T) down regulate MBL expression. On the basis of MBL mutations, haplotypes have been described associated to a null, intermediate or high protein activity. Null haplotypes are related to recurrent infections, is a negative modifier factor in cystic fibrosis causing a more severe liver expression (Tomaiuolo R, et al. Digest Liver Disease 2009) and reduce the down regulation of IL-1 beta, acting as a risk factor for gastric cancer in subjects bearing H. pylori (Scudiero O, et al. Clin Chem 2006). Despite such negative effects, we identified MBL mutations in 65% of 550 subjects from the general population of southern Italy. Other studies excluded a role of MBL variants in human diseases and MBL variant genotypes were associated to a less severe expression of Sjogren disease.

To further cast light on the effect of MBL gene variants, we studied a large population of ultracentenarian from Sardinia (selected by Prof. Deiana in the frame of the AKeA project). We hypothesize that a high MBL activity (and thus a reduced occurrence of mutations) would be an advantage for longevity. As expected, elder subjects had a significantly lower occurrence of MBL null haplotypes, but surprisingly, we recorded also a significantly lower occurrence of high activity haplotypes. The most frequent MBL haplotype observed in ultracentenarians was associated to an intermediate activity. We suggest that null MBL activity may be a disadvantage for longevity because it exposes to fatal infections. The high activity of the protein seems on turn to be disadvantageous probably because it exposes to a higher risk of autoimmunity, or to more severe phenotypes of autoimmune disease.

We acknowledge contributions from Regione Campania (DGRC 2362/07) and MiUR (PS 35-126/Ind).

030

**MISTRAFFICKING ANALYSIS OF SLC26A3 PROTEIN MUTANTS**

G. Cardillo<sup>1</sup>, F. Amato<sup>1</sup>, R. Cacace<sup>1</sup>, V. Borrelli<sup>1</sup>, G. Terrin<sup>2</sup>, A. Passariello<sup>2</sup>, R. Berni Canani<sup>2</sup>, G. Castaldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Univ. di Napoli "Federico II" and CEINGE, Biotecnologie Avanzate s.c. a r.l., Naples, Italy

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, Univ. di Napoli "Federico II", Naples, Italy

Background. Congenital chloride diarrhea (CLD) is an intestinal disorder caused by electrolytes imbalance due to SLC26A3 protein impairment, a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>#</sup> exchanger. In the last years we performed the molecular analysis on 15 CLD patients founding 6 novel missense mutations. Moreover, in a pilot study we administered butyrate salts (100 mg/kg/die) that resulted efficacy to normalize the chronic diarrhea (1). The aim of this study was to analyze the pathogenic role of mutations.

Methods. We isolated the SLC26A3 wild type cDNA from an intestinal RNA library (Invitrogen). cDNA was cloned in a GFP vector to obtain a fused protein to track for the localization analysis by confocal microscopy. All 6 mutants and a well characterized mutant (p.V317del) were obtained by PCR mutagenesis. Wild type and mutant vectors were transfected in HEK293 cell line and observed 24 hours past transfection.

Results. All mutants showed intracellular accumulation area. The absence of protein on membrane explains the pathogenic role of this mutations.

Conclusion. This study clearly confirm the pathogenic role of these novel mutations. This approach is necessary when a not previously described missense mutation was found in a patient to exclude a polymorphism. Further studies using different concentrations of butyrate salts in the growth media will be needed to study the therapeutic role of this molecule in the CLD.

**Bibliografia**

1. Canani RB, Terrin G, Cirillo P, et al. Butyrate as an effective treatment of congenital chloride diarrhea. Gastroenterology. 2004;127(2):630-634.

031

**MUTATIONS SCREENING FOR A CORRECT DIAGNOSIS OF PORPHYRIA IN SOUTH OF ITALY**

M. Savino<sup>1</sup>, M. Garrubba<sup>1</sup>, C.C. Guida<sup>2</sup>, A.P. Gallo<sup>1</sup>, M. Pileri<sup>1</sup>, E. Di Pierro<sup>3</sup>, M.D. Cappellini<sup>3</sup>, A. Potenza<sup>4</sup>, M. Caravella<sup>5</sup>, L. Zelante<sup>6</sup>, F. Aucella<sup>2</sup>, S.A. Santini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Analysis Laboratory, CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>2</sup>U.O. of Nefrology and dialisi, CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>3</sup>Dept. of Internal Medicine, University of Milan

<sup>4</sup>DSEMS, Dietology and Artificial Nutrition Service, CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>5</sup>Dept. of Mental Health, CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>6</sup>Medical Genetics Service, CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

**Background.** The porphyrias comprise a clinically and genetically heterogeneous group of diseases caused by deficiencies in the activities of the enzymes of the haem biosynthetic pathway.

**Objectives.** To investigate the molecular basis of porphyria, we performed the molecular analysis of HMBS gene responsible for acute intermittent porphyria (AIP), CPOX gene responsible for hereditary coproporphyria (HCP), PPOX gene responsible for variegate porphyria (VP) and UROD gene responsible for porphyria cutanea tarda (CTP).

**Patients.** Twenty unrelated patients with Porphyria attended to our Hospital. Of them, seventeen patients received a clinical diagnosis of AIP, whereas three a diagnosis of CTP. **Methods.** Mutation analysis of the HMBS, CPOX, PPOX and UROD were carried out. The coding exons and the flanking intronic regions were analyzed by direct sequencing.

**Results.** In seventeen patients diagnosed with AIP, we firstly analyzed HMBS gene and we detected in five of them three mutations previously described: the splicing site mutation c.652 -2delA, a single nucleotide deletion c.181delG and the non sense substitution c. 580C>T. In the remaining patients we successively performed the mutation analysis of CPOX gene and a novel missense mutations c.613G>T was found. In two of three patients with CTP two novel mutations in UROD gene were identified: the splicing substitution (c.942+1 G>C) responsible for deletion of exon 9 and a missense mutation (c.1000A>G) causative of a putative conformational change. No mutations were found in twelve patients, therefore the analysis of other gene and the search for deletions responsible for porphyria is in progress.

**Conclusions.** In summary, only for eight of twelve patients we were able to perform the molecular analysis for porphyria. Sometimes an accurate diagnosis of Porphyria might be difficult. Fortunately, the advances in the fields of molecular genetics during recent years allowed us to determine a correct diagnosis, to perform the appropriate therapy and to facilitate a genetic counselling of family members at risk.

**Reference**

1. Eur J Dermatol 2006;16(3):230-40.

032

**PANCREATIC CANCER (PC) GENE THERAPY WITH HEAT INDUCIBLE DIPHTHERIA TOXIN VARIANT CRM197 (DTA197): IN VIVO PRELIMINARY RESULTS**

S. Moz<sup>1</sup>, P. Fogar<sup>2</sup>, F. Navaglia<sup>3</sup>, L. Moserle<sup>4</sup>, D. Basso<sup>3</sup>, C.F. Zambon<sup>3</sup>, A. Padoan<sup>1</sup>, E. Greco<sup>1</sup>, E. Fadi<sup>1</sup>, S. Indraccolo<sup>5</sup>, S. Pedrazzoli<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies, University of Padova

<sup>2</sup>Dept. of Medical and Surgical Sciences, University of Padova

<sup>3</sup>Dept. of Laboratory Medicine, University of Padova

<sup>4</sup>Dept. of Oncology and Surgical Sciences, University of Padova

<sup>5</sup>Istituto Oncologico Veneto, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Padova

<sup>6</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies, Dept. of Laboratory Medicine, University of Padova

**Background.** Heat shock elements (HSEs) regulate gene transcription of heat shock proteins (HSPs) in response to cellular stress. We ascertained whether an artificial sequence encompassing five tandem HSEs inserted upstream the HSPA6 promoter, controlling the expression of DTA197, is suitable for PC gene therapy in vivo.

**Methods.** Seventeen female nude mice were s.c. inoculated with 3 millions of transfected (eGFP to optimize heat shock or DTA197 for tumor cell killing) or non transfected (control) PC PSN1 cells. To induce transgene expression heat shock was obtained by heating the cutaneous surface employing a device made in house.

**Results.** Optimal heat shock (9 fold increased of eGFP mRNA, Q-RT-PCR) was obtained by heating twice the tumor mass, 72 hrs interval. Heating did not significantly modify the growth pattern of control tumors, which was close to that of untreated PSN1-DTA197. DTA197 mRNA expression was quantified (Q-RT-PCR) in 4 tumor masses, 2 from a control and 2 from experimental mice. With respect to control masses, a 7.13 and 5.60 fold increase was found in the two heated masses. Tumor volume (calliper) of treated PSN1 DTA197 was delayed with respect to that in untreated PSN1-DTA197 masses (repeated measures analysis of variance: F=5.89, p=0.07). In one treated mouse a complete disappearance (10 days follow-up after treatment) of the tumor mass was documented both by calliper and by in vivo bioluminescence imaging.

**Conclusions.** DTA197 expression under the control of the heat inducible promoter engineered by us appears to be a promising tool in arresting PC growth in vivo.

**References**

1. Parry JJ et al. PET imaging of heat-inducible suicide gene expression in mice bearing head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Gene Ther* 2009;16:161-70.

033

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF APP ISOFORMS EXPRESSION IN PLATELETS FROM PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE AND HEALTHY CONTROLS**

M. Emanuelli<sup>1</sup>, D. Sartini<sup>1</sup>, L. Nanetti<sup>1</sup>, F. Raffaelli<sup>1</sup>, L. Provinciali<sup>2</sup>, L. Mazzanti<sup>1</sup>, A. Vignini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica, Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>2</sup>Dip. di Neuroscienze, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Alzheimer disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive and memory decline. In the past few years, different biochemical parameters in cerebral spinal fluid (CSF) or plasma have been investigated. It has been tried to identify peripheral markers of AD, focusing mostly on the amyloid precursor protein (APP). Different isoforms of APP are generated by alternative splicing. The three major isoforms are constituted of 770, 751 and 695 aa residues. APP 751 and APP 770 contain a Kunitz-type serine protease inhibitor domain (APP-KPI), and APP 695 lacks this domain.

In this regard, platelets represent an important peripheral source of APP. It has been demonstrated that three major APP isoforms with apparent molecular weight ranging from 106 to 130 kDa are inserted in the membrane of resting platelets and that both platelets and megakaryocytes express three transcripts encoding for the isoforms: APP 770, APP 751, APP 695.

Several studies reported alterations in APP metabolism/concentration in platelets of Alzheimer's Disease patients when compared to control subjects matched for demographic characteristics. These observations define the frame of the present study, which aims to investigate the expression level of different platelet APP isoforms using Real-Time PCR in patients affected by AD (n=20) and in age-matched controls (n= 10).

Differential gene expression measurements (AD versus control) revealed a significant up-regulation for total APP (1.49-fold), for APP-KPI (1.57-fold), for APP 770 (1.37-fold), for APP 751 (1.39-fold) and for APP 695 (1.33-fold). In the present study we have demonstrated that patients with AD are characterized by differential levels of platelet-derived APP isoforms, thus suggesting that APP could be considered a potential peripheral marker for diagnosis of Alzheimer disease.

034

**RICERCA DEL POLIMORFISMO IVS4-14A>G DEL GENE OLR1 IN PAZIENTI CON SINDROME METABOLICA**

B. Coppola<sup>1</sup>, V. Casieri<sup>1</sup>, F. Di Serio<sup>1</sup>, V.O. Palmieri<sup>2</sup>, G. Cardinale<sup>2</sup>, G. Palasciano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>U.O. Patologia Clinica I, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico Consorziale, Bari

<sup>2</sup>Clinica Medica "A.Murri" Università, Bari

Scopo. L'identificazione di SNPs del gene OLR1 (cr.12p12.3-13.1) ereditati come blocco di marcatori in linkage disequilibrium (OLR-1 LD) ha portato alla definizione di un aplotipo a rischio correlato ad infarto del miocardio. Poiché i fattori che caratterizzano la Sindrome Metabolica (SM) sono spesso associati al processo aterosclerotico ed al rischio cardiovascolare, abbiamo voluto valutare la distribuzione del genotipo a rischio per lo SNP del gene OLR1 in una popolazione selezionata per SM e verificare se tale genotipo correla con qualche parametro della SM. Materiali e Metodi. 55 pazienti con diagnosi di SM all'esordio (criteri ATPIII) e 39 soggetti controllo confrontabili per sesso ed età, sono stati sottoposti ad attento esame clinico, a valutazione del rischio cardiovascolare (PROCAM), dei parametri sierologici ed ad ultrasonografia carotidea. Per l'analisi molecolare del polimorfismo IVS4-14A>G, compreso nel blocco di LD del gene OLR1, è stato utilizzato il kit "LOXIN TEST" (Technogenetics). L'analisi statistica è stata effettuata con il software NCSS 2004 considerando statisticamente significativo  $p < 0,05$ . Risultati e Conclusioni. La distribuzione del genotipo a rischio GG e l'associazione con i fattori di rischio cardiovascolare nei gruppi di pazienti con e senza SM non è risultata statisticamente significativa. Tuttavia una stretta associazione è stata evidenziata tra il genotipo GG e iperglicemia a digiuno ( $r=0,287$  -  $p=0,005$ ) e microalbuminuria ( $r=0,2$ - $p=0,04$ ) confermata dall'analisi della varianza nei soggetti con genotipo GG rispetto a quelli con genotipo AG e AA (Diabete II  $p=0,005$ ; HOMA index  $p=0,04$ ; glucosio plasmatico  $p=0,005$ ; microalbuminuria  $p=0,03$ ). I risultati ottenuti sembrerebbero suggerire una associazione del genotipo a rischio GG per il polimorfismo IVS4-14A>G del gene OLR-1 con danni renali precoci in soggetti con SM e disturbi del metabolismo glucidico.

**Bibliografia**

1. Vecchione L, et al. Genotyping OLR1 gene: a genomic biomarker for cardiovascular diseases. Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery 2007;2:147-51

035

### ROLE OF GENETIC FACTORS RELATED TO DRUG METABOLISM (CYTOCHROME P450 2C9) AND TO DRUG TARGET (VITAMIN K EPOXIDE REDUCTASE) IN THE RESPONSE TO WARFARIN THERAPY

A. Bossone<sup>1</sup>, I. Mostarda<sup>1</sup>, N. Pepe<sup>1</sup>, C. Sepe<sup>1</sup>, P. Rotondo<sup>1</sup>, F. Capasso<sup>2</sup>, V. Russo<sup>2</sup>, A. Rocino<sup>2</sup>, M.L. Papa<sup>2</sup>, L. La Rocca<sup>3</sup>, M.T. Polistina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Lab. di Biochimica e Genomica Molecolare, PSI Loreto Crispi, Napoli

<sup>2</sup>U.O.C. Lab. di Emostasi e Trombosi, P.O. S.Giovanni Bosco, Napoli

<sup>3</sup>U.O.C. Medicina, P.O. Cardinale Ascalesi, Napoli

**Background.** Warfarin is a commonly used anticoagulant that requires careful clinical management to balance the risks of over anticoagulation and bleeding with those of undercoagulation and clotting. The aim of this preliminary study was to explore the contribution of genetic factors related to drug metabolism (cytochrome P450 2C9, CYP2C9) and to drug target (vitamin K epoxide-reductase, VKORC1) in the response to warfarin therapy.

**Methods.** We analyzed two single nucleotide polymorphisms (SNP) of CYP2C9 gene, such as allele CYP2C9\*2 (Arg144Cys) and CYP2C9\*3 (Leu359Ile), and a snp of VKORC1 gene (G-1693>A) in a population of 72 patients (38 men and 34 women, mean age 52), followed up at two specialized center during warfarin therapy, with international normalized ratio (INR) of the prothrombin time within the target range (1.00-4.35). Genotyping has been carried out on peripheral leukocytes DNA by molecular biology techniques (PCR, reverse-Hybridation).

**Results.** CYP2C9 genotyping showed that 47 patients were \*1/\*1, 25 patients were CYP2C9\*2 and/or \*3. VKORC1-1639G>A genotyping showed that 27 patients were homozygous AA, 40 were heterozygous GA, and 4 was homozygous GG genotype. Patients with VKORC1-1639 (G>A) GG+GA genotype required a significantly higher warfarin dose than those with AA genotype [(3.36±0.97) mg/d vs. (1.75±0.56) mg/d, P<0.01], and patients with CYP2C9\*1/\*1 genotype also required a higher warfarin dose than those with CYP2C9\*1/\*3 genotype [(2.06±0.83) mg/d vs. (1.55±1.32) mg/d, P<0.05]. The CYP2C9 and VKORC1 genotype together could explain the inter-individual variation in dose requirement of 64.1% patients.

**Conclusion.** This study showed that CYP2C9 and VKORC1 polymorphism had significant influences on warfarin dose requirements and should be considered on dosing regimens modification to improve the safety of warfarin therapy.

#### References

1. Adcock DM, Koftan C, et al. Effect of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 gene on warfarin anticoagulation. Arch Pathol Lab Med 2004;128:1360-3.

036

### RT-PCR METHOD FOR QUANTIFICATION OF TAURINE TRANSPORTER EXPRESSION FROM HUMAN LYMPHOCYTES OF DIABETICS AND NORMAL SUBJECTS

A. Baroncelli<sup>1</sup>, Z. Napoli<sup>1</sup>, R. Lari<sup>1</sup>, G. Seghieri<sup>1</sup>, L. Bianchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Laboratorio Analisi, ASL3 Osp. Pistoia

**Introduction.** The role of taurine in glucose metabolism regulation is extensively studied. When considering the clinical complications in diabetes, several links can be established between altered taurine metabolism and the development of cellular dysfunctions which cause the clinical complications in diabetes

**Purpose.** Development of a real-time pcr method for the quantification of Taut expression levels from human lymphocytes, in order to compare TauT expression among diabetics and control subjects.

**Methods.** Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells of 79 type 2 diabetes and 44 control subjects. Taut expression was quantified by real-time PCR using intercalation of SYBR Green. It was performed using a Mastercycler ep Realplex (Eppendorf) and a Rotor-gene 6000 (Corbett). We analyzed the relative gene expression data using the ##Ct method, comparing Taut expression with those of two housekeeping genes: GAPDH (for Mastercycler Realplex) and β-actin (for Rotor-gene). Performance of real-time pcr was assessed by standard curves obtained using serial dilutions of a Reference Total RNA (Stratagene).

**Results.** Real-time pcr efficiency was >95% in every run for both the instruments. The CV for the lower standard dilution was less 15% and 10% respectively using a Mastercycler ep Realplex and a Rotor-gene 6000. The last showed a better performance with 99.9 % efficiency rate. However, because of his better sensibility, 1:10 dilution of the samples was necessary to perform analysis on Rotor-gene 6000. Preliminary data showed an iperexpression of Taut in type 2 diabetic patients (##Ct= #Ct malati - #Ct sani= -2).

**Conclusions.** The reported data indicate that: 1)the method has an adequate sensibility and reproducibility for measuring TAUT expression in human lymphocytes; 2)by different instruments for RT-PCR quantitative analysis the method must be adapted changing housekeeping gene and the c-DNA quantity used;3) Rotor-gene 6000 showed a better performance with 99,9% efficiency rate and a less CV(10%)

#### References

1. Mochizuki T, Satsu H, Shimizu M. Signaling pathways involved in tumor necrosis factor alpha-induced upregulation of the taurine transporter in Caco-2 cells. FEBS Lett 2005 Jun 6;579(14):3069-74.

037

**STATO MUTAZIONALE DEL GENE IGVH NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: IL DATABASE DI RIFERIMENTO**

F. Sciarini<sup>1</sup>, C. Parma<sup>1</sup>, A. Cappellani<sup>1</sup>, F.M. Biella<sup>1</sup>, A. Soccodato<sup>2</sup>, S. Signorini<sup>1</sup>, M. Piatti<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio

<sup>2</sup>Divisione di Ematologia, Osp. S. Gerardo dei Tintori di Monza

<sup>3</sup>DIMS, Medicina e Clinica, Università Milano-Bicocca

**Introduzione.** Un fattore prognostico importante nei soggetti affetti da leucemia linfatica cronica (LLC) è lo stato mutazionale del gene IgVH, la cui determinazione dipende dal confronto tra la sequenza nucleotidica di IgVH espresso dal clone leucemico del paziente e la linea germinale della famiglia corrispondente. Se l'omologia calcolata è superiore al 98%, un soggetto è considerato non mutato e il decorso clinico risulta sfavorevole. Esistono diversi database di riferimento depositari delle sequenze nucleotidiche delle linee germinali, tra cui GenBank/IgBlast e ImMunoGeneTics information system (IMGT). Scopo del lavoro è stato studiare quale database fornisce una valutazione più accurata dello stato mutazionale di IgVH. **Materiali e Metodi.** Sono stati analizzati 182 pazienti affetti da LLC in cura presso le Divisioni di Medicina dei nostri ospedali. Lo stato mutazionale di IgVH è stato esaminato tramite sequenziamento automatico (ABI PRISM 310, Applied Biosystems). Le sequenze sono state allineate utilizzando GenBank/IgBlast e IMGT.

**Risultati.** Le sequenze identificate come pseudogeni (9) o come riarrangiamenti non produttivi (1) sono state escluse. Per le 172 sequenze rimanenti la percentuale di omologia è stata valutata con entrambi i database. In 5 soggetti i due database assegnano una famiglia differente. La percentuale di omologia data dai due database risulta identica in 85 casi (50.9%) mentre nei restanti 82 (49.1%) presenta una differenza compresa tra lo 0.15% e il 6.37%. L'attribuzione della percentuale di omologia è importante nei casi vicini al valore soglia. Nel nostro studio 5 soggetti (3%), con omologia vicina al cut-off, presentano un differente stato mutazionale a seconda del database. Studi recenti inoltre rilevano che un'omologia del 100% è di per sé associata a un decorso clinico peggiore rispetto a percentuali di omologia superiori al cut-off. In 12 soggetti, IMGT assegna un'omologia del 100% e GenBank/IgBlast un'omologia tra il 99.9% e il 98%.

**Conclusioni.** IMGT risulta un database più comprensivo e aggiornato, contiene un maggior numero di alleli e sequenze germinali, permettendo di definire la percentuale di omologia, e quindi il valore prognostico, in modo più accurato.

**Bibliografia**

Davi F, Leukemia 2008;22:212-4.

038

**THE ROLE OF GENETIC POLIMORPHISMS IN WARFARIN TREATMENT**

S. Gabba<sup>1</sup>, A. Verri<sup>1</sup>, G.M. Podda<sup>2</sup>, V. Grazioli<sup>1</sup>, E. Grossi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sez. Biologia Molecolare, Centro Diagnostico Italiano, Milano

<sup>2</sup>Osp. San Paolo, Milano

<sup>3</sup>Farma Italia, Bracco S.p.A., San Donato Milanese (MI)

Warfarin is a vitamin K dependent oral anticoagulant used for the treatment of deep venous thrombosis, pulmonary embolism and ictus. Despite its proven efficacy Warfarin causes high numbers of adverse drug reactions (ADR) and it is difficult to reach a standard dose for the treatment because of its great individual variability. During the first days of treatment 39% of patients (USA) have severe ADRs. The safety of the treatment with Warfarin requires accurate monitoring and frequent dosage adjustments. The variability of the response to the drug is due to physiological factors (age, sex, gender, weight) but also to genetic factors. The genetic polymorphisms of 30 genes are involved in the variation of the Warfarin response during treatment. The two most important genes are VKORC1 and CYP2C9 and they are responsible of the 30-40% of the inter-individual variability.

**Aim.** Evaluate the prevalence of the polymorphisms of the two genes VKORC1 and CYP2C9 in the Italian population and set up a pharmacogenetic algorithm to estimate the appropriate therapeutic dosage.

**Methods.** We collected 500 patients from San Paolo Hospital in Milan. After DNA extraction we analyzed the genetic polymorphisms using an automated microarray platform (INFINITI Analyzer, Autogenomics).

**Results.** The allelic frequency of the polymorphisms of CYP2C9 (\*2 and \*3, 14% and 11%) and VKORC1 (3673, 6484 and 9041, 46%, 46% and 31% respectively) reflects previous literature data. We also analyzed new genetic variants of the VKORC1 gene (5808, 6009, 6853, 7566) which are present with an allelic frequency of 36%, 17%, 42% and 46% respectively.

**Conclusions.** The association between genetic inter-individual variability and the response to Warfarin treatment is important for a new personalized medicine and to set up the correct treatment for each patient considering his genetic variability.

**References**

1. Wadelius M, Chen LY et al. 2007. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. Hum Genet 2007 Mar;121(1):23-34. Epub 2006 Oct 18.

039

**BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) POLYMORPHISM AND METHYLATION IN SUICIDE VICTIMS: A STUDY OF 512 CASES**

F. Zarrilli<sup>1</sup>, S. Keller<sup>2</sup>, S. Sacchetti<sup>2</sup>, M. Sarchiapone<sup>3</sup>, A. Marusic<sup>4</sup>, T. Zagar<sup>4</sup>, V. Carli<sup>4</sup>, A. Roy<sup>5</sup>, L. Chiariotti<sup>2</sup>, G. Castaldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università Federico II, Napoli, CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli

<sup>3</sup>Dip. di Scienze per la Salute, Università del Molise, Campobasso, Italy

<sup>4</sup>University of Primorska, Slovenia

<sup>5</sup>Psychiatry Service, Department of Veteran Affairs, New Jersey, USA

Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a neurotrophin involved in plasticity of cholinergic and serotonergic neurons. An altered expression of BDNF was found in brain of suicide victims suggesting that alterations of the BDNF system may impair neural plasticity and therefore reduce the individual's ability to adapt to crisis situation, also leading to suicidal behavior. The G196A variant of BDNF gene causes a Val to Met substitution in the pro-BDNF protein that impairs the brain trafficking of BDNF. We reported a higher rate of suicide attempters in a subset of 170 caucasian depressed patients bearing the Val66Met polymorphism (Sarchiapone M, et al. 1998). In the present study we analyzed DNA from Wernicke area in 512 subjects (262 suicide and 250 controls). BDNF G196A was analyzed by PCR-RFLP. Frequencies for genotypes GG, GA and AA were 61.5%, 34.4% and 4.1% respectively, with no significant differences between suicide victims and controls (chi square=.318, p=.853). Thus, we excluded a significant association between BDNF Val66Met polymorphism and suicide, differently from what we observed previously on suicide attempters, thus confirming that completed and attempted suicide are two distinct phenomena and different genetic mechanisms may be involved. Thus, we tested the hypothesis that alterations of DNA methylation could be involved in the dysregulation of BDNF expression in the brain of suicide subjects. We determined the DNA methylation degree at BDNF promoter IV and the genome-wide DNA methylation in the brain's Wernicke's area of 44 suicide completers and 33 non-suicide controls. Brain samples from suicide subjects showed a significant increase of DNA methylation at specific CpG sites in the BDNF promoter/exon IV compared to controls (One-way ANOVA, F=13.7, p<0.001). Higher methylation degree corresponded to lower BDNF mRNA levels. Global DNA methylation did not correlate with BDNF methylation degree or suicidal behaviour. These data indicate that a gene-specific increase in DNA methylation could contribute to down-regulate BDNF expression in suicide subjects, revealing a novel link between epigenetic alterations in brain and suicide. We acknowledge contributions from Regione Campania (DGRC 2362/07) and MiUR (PS 35-126/Ind).

040

**MUTATIONS SCREENING OF DYNEIN GENES IN PATIENTS AFFECTED BY PRIMARY CILIARY DYSKINESIA OR KARTAGENER SYNDROME**

C. Cozzolino<sup>1</sup>, G. Frisso<sup>1</sup>, S. Zanotta<sup>1</sup>, F. Santamaria<sup>2</sup>, F. Salvatore<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy & Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università "Federico II", Naples, Italy

<sup>2</sup>Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II", Naples, Italy

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is the most prominent genetic abnormality involving motile cilia. PCD is a rare (1:15,000), autosomal recessive, genetically heterogeneous disorder, characterized by sino-pulmonary disease and male infertility. Presence of laterality defects set up the Kartagener syndrome (KS, prevalence = 1:30,000). Ciliary ultrastructural defects are identified in about 90% of PCD patients and involve the dynein arms. Recent mutational analysis demonstrated that about 40% of PCD patients carry mutations of the dynein genes DNAI1 and DNAH5, which encode for the intermediate and high chains of dynein, respectively.

The aim of our study was to perform molecular screening of 28 Southern-Italy independent patients affected by PCD (n= 8) or KS (n= 20) syndrome. We set up a protocol to amplify the 80 DNAH5 and the 20 DNAI1 exons by means 30 and 8 multiplex-PCR, respectively. Particularly, 38 different multiplex-PCR were made using 10 different annealing temperatures.

So far, we have analysed 10 patients and we identified 4 new mutations in the DNAH5 gene in 3 independent patients: p.R224X, p.Q1450X, p.R1883X and c.3876\_4053+158del. Mutations p.R224X, p.Q1450X and p.R1883X introduce a stop codon, producing truncated proteins. We analysed mRNA extracted from nasal brushing to evaluate effects of c.3876\_4053+158del and identified 3 fragments of unequal intensity: a WT fragment, a fragment with deletion of exon 25, and a fragment with deletion of exon 25 and insertion of intron 26. We are now performing in vitro splicing assay to better characterize this splice site mutation.

Moreover, we identified 4 missense variations in the DNAH5 gene in 4 patients: p.N402K, p.N549K, p.A3597S and p.F4201F. Variations p.N402K and p.N549K were found in healthy population at frequency of 2 and 0,77%, respectively. Therefore these variants may be considered polymorphisms of DNAH5 gene. Variations p.A3597S and p.F4201F were excluded in 656 and 322 chromosomes, respectively. More data are necessary to evaluate the pathogenetic role of these new variants.

Furthermore, we purpose to use the new technology of ultra-high throughput DNA sequencing for a much more extensive study of all the loci that may be involved in PCD and KS.

Zariwala MA, Annu.Rev.Physiol. 2007

041

**MUTAZIONE JAK2 NELLE MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE PH NEGATIVE**

E. Rimini<sup>1</sup>, E. Saba<sup>1</sup>, G. Rocca<sup>2</sup>, A. Pinna<sup>1</sup>, R. Serra<sup>1</sup>, S. Vargiu<sup>2</sup>, L. Rubattu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi chimico-cliniche, Osp. SS.ma Annunziata, Sassari

<sup>2</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Univ. di Sassari

Dal luglio 2006 è stato introdotto presso il settore di biologia molecolare del laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia dell'Ospedale di Sassari SS.ma Annunziata, un nuovo esame: la ricerca del polimorfismo della mutazione puntiforme V617F del gene JAK-2. Tale gene è coinvolto nella patogenesi delle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative (Ph-CMPD) quali la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE) e la mielofibrosi idiopatica (IMF). La patogenesi delle Ph-CMPD è legata all'attivazione della via di trasduzione del segnale JAK-STAT. La mutazione JAK2V617F (JAK2) causa la sostituzione del residuo di valina in posizione 61 con un residuo di fenilalanina, eliminando l'attività regolatoria e attivando costitutivamente il dominio chinasi inducendo così la fosforilazione di STAT5.

Lo scopo del lavoro è stato quello di fornire un esame di biologia molecolare per discriminare le malattie mieloproliferative in tempi brevi nel Nord Sardegna.

L'esame si esegue sui granulociti ottenuti per gradiente di densità da sangue intero e conservati a -20°C fino alla fase di estrazione del DNA. Il DNA viene estratto utilizzando il metodo su colonnina Quiagen e viene successivamente amplificato utilizzando primers allele-specific secondo il lavoro di Baxter et al. (1). I prodotti di amplificazione sono visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Sono stati analizzati 450 campioni di cui 147 sono risultati positivi: presenza del polimorfismo JAK2. I risultati ottenuti hanno evidenziato l'importanza degli esami di biologia molecolare nell'ambito della diagnostica clinica, in particolare le richieste sono pervenute non solo dagli Ospedali di Sassari ma anche dai centri di Tempio, Olbia, Ozieri ed Alghero.

L'obiettivo futuro sarà la messa a punto delle metodiche per la discriminazione tra omozigote ed eterozigote per JAK2, poichè studi di correlazione clinico molecolare su pazienti affetti da PV omozigoti e eterozigoti hanno evidenziato l'importanza dell'effetto del gene-dosage sul fenotipo.

**Bibliografia**

Baxter et al. Acquired mutation of tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005.

042

**RAPID UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> GENOTYPING BY HIGH-RESOLUTION-MELTING-CURVE ANALYSIS (HRM) FOR GILBERT'S SYNDROME DIAGNOSIS**

A. Minucci<sup>1</sup>, P. Concolino<sup>1</sup>, C. Zuppi<sup>1</sup>, B. Giardina<sup>1</sup>, E. Capoluongo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Clinical Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Rome, Italy

**Background.** The basis of Gilbert's syndrome is a 70% reduction in bilirubin glucuronidation catalyzed by the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene, which results in TA homozygous insertion in the Caucasian population within the promoter region of the UGT1A1 gene (UGT1A1\*28 allele). Homozygous UGT1A1\*28 carriers can suffer from severe irinotecan toxicity or jaundice during treatment with the protease inhibitor atazanavir.

**Methods.** We setup a method, based on high resolution melting (HRM) technique (performed on Roche Light Cycler 480 instrument and using all chemicals and probes by Roche Diagnostic), for UGT1A1 TA evaluation. Patients (n= 30), previously typed for UGT1A1 TA-insertions by sequencing analysis on ABI-Prism 3100A, were used for the setup.

**Results.** The wild-type 6TA/6TA, the homozygous mutant 7TA/7TA and the heterozygous samples, were successfully detected using HRM analysis, since the TA insertion alters the derivative melting curve shape and the melting temperature (T<sub>m</sub>). All different genotypes were perfectly identifiable and genotyped by the HRM assay, since a unique derivative melting curve shape corresponds to each genotype.

**Discussion.** Different methods for genotyping the (TA)<sub>n</sub> polymorphism have been previously reported, including pyrosequencing, dHPLC, SSCP and melt-curve analysis. However, direct sequencing of the UGT1A1 promoter region, although relatively expensive, laborious and time consuming, still remains the gold standard method for genotyping the UGT1A1 variants. Herein, we describe, for the first time, a new HRM method for a rapid UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> genotyping. Since the Food and Drugs Administration has already recommended a reduced starting dose of the anti-tumor agent irinotecan for patients homozygotes for the UGT1A1\*28 allele, the availability of a simple, fast, and robust method for genotyping the UGT1A1 TATA box could be extremely important. The methodology described here represents a valid alternative to sequencing, being more rapid (less than 3 hrs), easy and less expensive.

**Conclusions.** The HRM methodology represents a significant advance in SNPs detection. For the first time, we present an application of HRM technology for the identification of TA insertion in UGT1A1 TATA box region.

043

**THREE NOVEL CFTR MICROSATELLITES IMPROVE SEGREGATION AND PREIMPLANTATION ANALYSIS FOR CYSTIC FIBROSIS**

A. Elce<sup>1</sup>, A. Boccia<sup>1</sup>, G. Cardillo<sup>1</sup>, S. Giordano<sup>1</sup>, R. Tomaiuolo<sup>1</sup>, G. Paoletta<sup>1</sup>, G. Castaldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Naples, Italy, CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Naples, Italy

**Background.** Molecular diagnosis for cystic fibrosis (CF) is based on the direct identification of mutations in the CFTR gene (detection rate about 90% with scanning procedures) and on segregation analysis of intragenic polymorphisms for carrier and prenatal diagnosis in about 20% of CF families in which 1 or both causal mutations are unknown (Castaldo G, et al. *Ann Hum Genetics* 2005).

**Methods.** We identified 3 novel intragenic polymorphic repeats (IVS3polyA, IVS4polyA, and IVS10CA repeats) in the CFTR gene and developed and validated a procedure based on the PCR followed by capillary electrophoresis for large-scale analysis of these polymorphisms and the 4 previously identified microsatellites (IVS1CA, IVS8CA, IVS17bTA, and IVS17bCA repeats) in a single run. Capillary electrophoresis was performed on the Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. We validated the procedure on DNA from both single and 2-cell samples (for a possible use in preimplantation diagnosis), and assessed the heterozygosity of the markers on 145 unrelated individuals from southern Italy: 96 CF patients bearing different genotypes and 49 non-CF controls.

**Results.** The allelic distribution and heterozygosity results suggest that the 3 novel polymorphisms strongly contribute to carrier and prenatal diagnosis of CF in families in which one or both causal mutations have not been identified. At least 1 of the 7 polymorphisms was informative in 98/100 studied families. Furthermore, the procedure allowed to analyze DNA from single-cell samples in about 80% of studied samples. Finally, our study revealed that most CF mutations are associated with different haplotypes, suggesting multiple slippage events but a single origin for most CFTR mutations.

**Conclusions.** The high efficiency and the short assay time (5 h including DNA extraction) suggest that the procedure may be routinely used for carrier, prenatal or preimplantation diagnosis of CF.

We acknowledge contributions from Regione Campania (DGRC 2362/07) and MiUR (PS 35-126/Ind).

044

**UTILITÀ DELLA TIPIZZAZIONE HLA NELLA DIAGNOSI DI CELIACHIA**

C. Tiberio<sup>1</sup>, A. Russo<sup>1</sup>, G. Parisio Perrotti<sup>1</sup>, M. Sansone<sup>1</sup>, M.T. Polistina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Lab. di Biochimica e Genomica Molecolare P.S.I. Loreto Crispi, Napoli

**Scopo del lavoro.** Ci proponiamo di valutare l'utilità della determinazione dell'aplotipo HLA predisponente alla malattia celiaca (MC), nei soggetti in cui la valutazione istologica, morfometrica ed immunoistochimica della mucosa intestinale non consenta di confermare o escludere il sospetto di una enteropatia glutine-dipendente. La MC, infatti, si associa frequentemente alla presenza degli alleli DQA1\*0501/DQB1\*0201 o DQA1\*0501/DQB1\*0202 (eterodimero DQ2) e DQA1\*0301/DQB1\*0302 (eterodimero DQ8).

**Materiali e Metodi.** Circa 200 pazienti, pervenuti a noi nell'ultimo biennio, sono stati sottoposti alla diagnosi genetica di MC. In tutti risultava soddisfatto almeno uno dei seguenti criteri: a) familiarità b) presenza di lesioni mucosali "minime o borderline"; c) positività ai marcatori sierologici di celiachia, in assenza di una chiara atrofia dei villi intestinali; d) mucosa normale in soggetti già in trattamento con dieta priva di glutine senza aver atteso la adeguata e necessaria conferma istologica. Abbiamo utilizzato due diverse metodiche di amplificazione genica (PCR) con primers sequenza-specifici PCR-SSP (Sequenze Specifici Primers) e rivelazione mediante elettroforesi su gel di agarosio.

**Risultati.** Il nostro studio ha confermato quanto già descritto in letteratura: il 90-95% dei pazienti presenta l'eterodimero DQ2, il 5% l'eterodimero DQ8. Abbiamo, altresì, trovato una quota minima di pazienti (meno del 2%) caratterizzati dalla presenza degli alleli DQA1\*0505/DQB1\*0301 (DQ7) con biopsia positiva e/o markers sierologici positivi.

**Discussione e Conclusioni.** Intendiamo ampliare la casistica al fine di ottenere una migliore caratterizzazione di quest'ultimo gruppo di pazienti, per poter utilizzare l'indagine genetica come test di screening di primo livello, al fine di escludere la malattia sia nei gruppi a rischio che in tutti quei casi nei quali l'esame istologico della mucosa intestinale non sia dirimente, in pazienti che seguano una dieta priva di glutine. Tale approccio diagnostico potrebbe consentire di evitare, follow-up a lungo termine, con un minor disagio per il paziente, ed una riduzione dei costi economici.

**Bibliografia**

1. Tonutti E. La diagnosi di celiachia: non solo anti-transglutaminasi. *RIMeL/IJLaM* 2008;4(Suppl.)68-71.

045

**DIAGNOSTIC VALUE FOR N2Ras MUTATIONS IN THYROID CANCER BY PYROSEQUENCING**

T. Di Matola<sup>1</sup>, M.R. Sapio<sup>2</sup>, A. Guerra<sup>2</sup>, I. Moretti<sup>2</sup>, V. Marotta<sup>2</sup>, M. Deandrea<sup>4</sup>, P.P. Limone<sup>4</sup>, M. Motta<sup>4</sup>, G. Rossi<sup>3</sup>, M. Vitale<sup>2</sup>

<sup>1</sup>C.T.O., A.S.L. Napoli Centro, Naples

<sup>2</sup>Dip. di Endocrinologia e Oncologia Molecolare e Clinica, Università di Napoli Federico II, Naples

<sup>3</sup>Dip. Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università di Napoli Federico II, Naples

<sup>4</sup>ASO Ordine Mauriziano di Torino, Ospedale Umberto I, Turin

Thyroid nodules are very common in the general population and are usually benign lesions. However, 4-5% of clinically apparent thyroid nodules actually harbour malignancy. Fine-needle aspiration biopsy (FNAB) is the primary means to distinguish benign from malignant nodules and select patients for surgery. Adjunctive diagnostic tests are needed in 20-40% of the cases, where the FNAB yields uncertain results. Mutations of the Ras proto oncogenes, can be used as a marker of neoplasia in thyroid carcinoma. However they appear rare as determined by single-strand conformation polymorphism (SSCP) and direct dideoxy DNA sequencing of RT-PCR products. The presence of stromal or non tumoral cells in the samples, lower the sensitivity of these methods, leading to false negative results. Pyrosequencing is a new and more sensitive analytical method to search for single point mutations. This method provides with the percentage of mutant DNA present in a RT-PCR product.

Aim of the study was to determine whether pyrosequencing analysis is suitable for searching of N2Ras mutations in thyroid specimens.

**Patients and Methods.** A total of 64 thyroid tissue samples, including benign nodules (N=8), follicular carcinomas (FTC, N=20) and papillary carcinomas (PTC, N=50) were analyzed by pyrosequencing for the presence of N2Ras mutation at codon 61. The analysis was performed in duplicates or triplicates and samples with standard deviation higher than 3% were excluded.

**Results.** No mutations were detected in 8 benign nodules. N2Ras mutations at codon 61 were found in 20% of FTC and 13.2% of PTC. The percentage of mutated N2Ras in tumor samples was in the range 12%-50%.

**Conclusions.** Pyrosequencing is suitable for detecting the N2Ras mutation in thyroid samples and is superior to dideoxy sequencing when low amounts of the mutant template are present. The prevalence of N2Ras mutations in thyroid carcinomas determined by pyrosequencing is higher than that determined by conventional methods.

046

**ERRORI IN COAGULAZIONE**

A. Tappi<sup>1</sup>, D. Cetta<sup>1</sup>, A. Ciambella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Azienda Ospedali Università di Foggia

**Scopo.** In questi ultimi anni, l'incremento delle richieste di test per lo studio della coagulazione ha favorito il processo di automazione di questi esami, che in precedenza erano completamente manuali.

E' quindi ancora più importante, vista la elevata mole di lavoro, monitorare le variabili che possono influenzare un corretto risultato, dal momento che possono causare errori nella gestione del paziente esponendolo a gravi rischi. Il nostro laboratorio processa circa 50.000 campioni annui per test coagulativi, utilizza controlli di qualità interni ed aderisce a controlli di qualità esterni.

I campioni pervenuti per il dosaggio di PT e aPTT, che sono la maggioranza, sono sempre controllati visivamente per eliminare i campioni coagulati e le provette non correttamente riempite o non identificabili, prima di avviare il lavoro strumentale automatico. Abbiamo comunque deciso di eseguire una indagine, per valutare quanto influisca nell'errore di risultato, la fase pre analitica di prelievo errato per la scarsa quantità del campione raccolta, dal momento il rapporto fra sangue e anticoagulante è critico per un corretto risultato dei test della coagulazione.

**Metodo.** Abbiamo testato 50 campioni prelevati a donatori in doppio, con provette riempite correttamente e provette con il 20% in meno di campione. I dosaggi del PT e aPTT sono effettuati con coagulometro Dasit Sysmex CA 7000, con reagenti forniti dalla stessa ditta.

**Risultati.**

Provette correttamente riempite: media PT 12.3 secondi, media aPTT 37.3 secondi

Provette insufficienti : media PT 14.2 secondi, media aPTT 61 secondi

**Conclusioni.** I valori del PT delle provette riempite in maniera insufficiente sono mediamente più alti del 13 % dei valori trovati in provette normali. I valori del aPTT delle provette riempite in maniera insufficiente sono mediamente più alti del 39% dei valori trovati in provette normali.

Il prelievo errato incide molto di più sul valore del aPTT.

**Bibliografia**

Variabili preanalitiche nello studio dell'emostasi - GdS coagulazione SIMeL Riv.Med Lab- JLM, vol.4,S. 1, 2003.

047

**ALTERAZIONE DELLA COAGULAZIONE E MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA**

M. Ammirabile<sup>1</sup>, A. Ruocco<sup>1</sup>, A.L. Ruocco<sup>2</sup>, A. De Renzo<sup>1</sup>, E. Cimino<sup>2</sup>, A.M. Cerbone<sup>2</sup>, M. Di Minno<sup>2</sup>, F. Pane<sup>1</sup>, G. Di Minno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, AOU "Federico" II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, AOU "Federico" II, Napoli

Scopo dello studio. Il riscontro di inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione è raro e attribuito alla presenza di specifici auto-anticorpi. Auto-anticorpi contro tutti i fattori sono stati riportati in malattie immunologiche o linfoproliferative. Il nostro studio ha esaminato le cause delle alterazioni emocoagulative in un paziente con manifestazioni emorragiche con storia personale e familiare negativa.

Metodi. In presenza di PT e aPTT patologici sono stati effettuati: il test di correzione con plasma normale, test al polibrene, il dosaggio dei singoli fattori della coagulazione e dell'anticoagulante lupico. La ricerca degli inibitori dei fattori è stato eseguito con metodo Bethesda. Per i seguenti test si è utilizzato un coagulometro (BCS) e i reagenti Siemens. Gli anticorpi anticardiolipina con test immunoenzimatico Aeskulisa.

Risultati. Gli esami di laboratorio eseguiti all'ingresso evidenziavano una pancitopenia, un PT e aPTT patologici, con funzionalità renale ed epatica nei limiti. Dall'approfondimento diagnostico si evidenziava deficit di vari fattori della coagulazione con presenza di inibitore del Fattore V e positività all'anticoagulante lupico. Per verificare una relazione tra le alterazioni coagulative e una malattia linfoproliferativa, si è effettuata una BOM, che ha diagnosticato un linfoma maligno a cellule B CD22+. Dopo terapia con chemioterapici (protocollo CEOP) si evidenziava remissione apparentemente completa della malattia e miglioramento dei parametri emocoagulativi con scomparsa dell'inibitore per il fattore V. Dopo 30 mesi il paziente presentava ematoma retroperitoneale. Gli esami di laboratorio rievdenziavano un PT e aPTT patologico, deficit fattoriale multiplo, presenza di inibitori per più fattori. Il paziente mostrava recidiva di malattia linfoproliferativa a cellule B e iniziava il CEOP, con graduale miglioramento del PT e aPTT e scomparsa degli inibitori.

Conclusioni. In presenza di PT e aPTT allungati, carenza fattoriale multipla e anamnesi familiare negativa, si deve considerare una patologia emorragica acquisita di tipo autoimmunitario. La presenza di inibitori in questo tipo di pazienti può riconoscere un'origine paraneoplastica.

**Bibliografia**

Ai Leen Ang - Thromb Haemost 2009;101:852-859.

048

**RUOLO DEL LABORATORIO NEL MONITORAGGIO DEL PAZIENTE IN TERAPIA ANTIAGGREGANTE**

M. Vidali<sup>1</sup>, P. Pergolini<sup>1</sup>, C. Cassani<sup>1</sup>, M. Manzini<sup>1</sup>, M.D. Prando<sup>2</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

<sup>2</sup>S.C.D.O. Cardiologia 2, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

L'analizzatore PFA100 è largamente utilizzato nella valutazione della funzionalità piastrinica in pz in trattamento con ASA. Tuttavia, l'applicazione tout-court di cut-off calcolati in soggetti sani a pz con differenti patologie cardiovascolari esita spesso in falsi negativi, interpretati erroneamente come resistenza ad ASA. In questo lavoro abbiamo confrontato la metodica PFA100 con il test di aggregazione Multiplate.

246 pz, provenienti dai reparti di Cardiologia e Chirurgia Vascolare, trattati con ASA e/o clopidogrel a differenti dosaggi, sono stati studiati con test di funzionalità piastrinica PFA100® (sangue intero), che utilizza cartucce contenenti Collagene/Epinefrina (Col/Epi, cut-off 165s) e Collagene/ADP (Col/ADP), e con test di aggregazione piastrinica per impedenza Multiplate® (sangue intero) che utilizza ac. arachidonico (ASPI test, pos se <862), ADP (ADP test), o collagene (COL test, pos se <607). Dei 246 pz studiati, solo 96 (39%) presentavano un valore di Col/Epi allungato (>165s); tuttavia 233 (95%) avevano un ASPI test inferiore a 862, ad indicare l'efficacia della terapia con ASA (mediana 209, IQR 156-343, min-max 16-855). Un'associazione statisticamente significativa era presente tra ASPI test e COL test (ma non con Col/Epi), sia come valori continui (spearman r=0,61 p<0,001) che positività (fisher test p<0,001). Sebbene i pz ASPI+ non presentassero valori di Col/Epi significativamente aumentati rispetto a quelli con ASPI normale (p=0,295), i pz con ASPI<400 (75° percentile del gruppo ASPI+) mostravano sia un COL test diminuito (503, IQR 389-633 vs 764, IQR 587-920; MW p<0,001) che un Col/Epi test aumentato (156, IQR 112-300 vs 112, IQR 93-152; MW p<0,001) rispetto ai pz con ASPI>400.

I dati suggeriscono che l'utilizzo combinato del PFA100 con Multiplate è essenziale per un corretto monitoraggio dell'efficacia della terapia antiaggregante, consentendo l'identificazione di pz con terapia adeguata (Col/Epi allungato ovvero Col/Epi norm e COL+/ASPI+), quelli che necessitano un aggiustamento del dosaggio (Col/Epi norm e COL-/ASPI+/-) o un cambio della terapia (Col/Epi norm e COL-/ASPI<400).

**Bibliografia**

Mueller T. et al. Clin Appl Thromb Hemost 2008 [Epub ahead of print]

049

**VALUTAZIONE DELL'INR E RANGE TERAPEUTICO IN PAZIENTI IN TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE**

V. Zanfino<sup>1</sup>, S. Leonardi<sup>1</sup>, G. Allegretti de Lista<sup>2</sup>, G. Barone<sup>2</sup>, G.A. Giovannetti<sup>2</sup>, V. Celestino<sup>2</sup>, A. Mazzella<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro FCSA Lab. di Patologia Clinica e Microbiologia DS 27 ASL NA 1 centro

<sup>2</sup>Lab. di Patologia Clinica e Microbiologia DS 27 ASL NA 1 centro

Lo studio si propone una verifica della qualità del servizio che noi erogiamo ai pazienti in TAO che si rivolgono al nostro centro, affiliato alla FCSA (Federazione Centri per la diagnosi della trombosi e la Sorveglianza delle terapie Antitrombotiche) dal 2007. Abbiamo valutato le variazioni dell'INR su un campione di pazienti da noi trattati, nell'arco dell'anno 2008, in relazione al range terapeutico previsto. In collaborazione con l'FCSA, è stato eseguito il controllo di qualità interlaboratorio del trattamento terapeutico, che si ottiene valutando la percentuale dei controlli entro il range terapeutico (Qualità media periodica) e la percentuale del tempo entro il quale i pazienti si sono mantenuti nel range terapeutico (Interpolazione lineare). Il metodo di analisi statistica utilizzata è l'analisi della percentuale dei controlli rispetto al range terapeutico (Qualità media periodica).

**Materiali e Metodi.** Il campione esaminato è stato di 49 pazienti seguiti con continuità nell'arco dell'anno 2008, ed in terapia con Coumadin per le seguenti patologie: 33 per cardiopatie, 13 per protesi valvolari e 3 per trombosi venose. La determinazione dell'INR è stata eseguita adoperando il reagente Thromborel S sul sistema coagulativo BCT della ditta Dade-Behring.

**Risultati.** Il numero dei controlli dell'INR nell'anno è stato di 701. Il valore medio dell'INR è risultato di 2,54 con una deviazione standard di 0,57. Abbiamo ottenuto che il 15,41% dei pazienti è risultato al di sopra della media, il 60,77% è risultato entro la media, il 23,82% al di sotto di essa.

**Valutazioni e Conclusioni.** Dai dati esposti in precedenza, si deduce che la Qualità Media Periodica (QMP) ottenuta dal nostro centro è stata: valori dell'INR del 15,41% al di sopra del range; del 60,77% entro il range, e del 23,82% sotto il range. La media dell'INR riscontrata è stata del 2,54. La media dei centri FCSA che hanno partecipato al controllo di qualità è stata la seguente: il 16,0% al di sopra, il 57,3% entro, il 26,7% al di sotto. La media dell'INR è stata del 2,61.

La QMP ottenuta dal nostro centro risulta essere perfettamente in linea con la media dei centri FCSA. Riteniamo opportuno rielaborare in studi futuri i dati ottenuti su un campione più ampio.

050

**INCIDENZA DI EMORRAGIE CEREBRALI IN PAZIENTI IN TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE NEL PERIODO 2002-2008 NELLA ASL 4 CHIAVARESE**

G. Devoto<sup>1</sup>, S. Massaro<sup>1</sup>, V. Marre<sup>1</sup>, M. Neri<sup>1</sup>, R. Ceccarelli<sup>1</sup>, M.P. Saggese<sup>2</sup>, S. Cuneo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Osp. Lavagna, Genova

<sup>2</sup>Pronto Soccorso, Osp. Lavagna, Genova

Lo scopo del lavoro è stimare l'incidenza di Emorragie Cerebrali (EC) nei pazienti sottoposti a terapia con AntiCoagulanti Orali (TAO), verificando la coesistenza di possibili fattori di rischio, al fine di valutare l'outcome della TAO e le possibili azioni preventive atte a ridurre la frequenza di EC. Sono stati analizzati i pazienti visitati nel Pronto Soccorso (PS) dell'ASL 4 "Chiavarese", sede di DEA di I livello, con diagnosi di EC, negli anni 2002/2008. In totale sono state diagnosticate 517 EC e di queste 31 (5.9%) in pazienti sottoposti a TAO (25 Warfarin e 6 Acenocumarolo), di cui 12 donne e 19 uomini con età media pari a 84±7 aa.. Questi pazienti erano in trattamento con TAO per fibrillazione atriale (15), trombosi venosa profonda/emboлия polmonare (4), protesi valvolari meccaniche (4), stroke (5), altre diagnosi (3). In 6 casi l'EC è stata secondaria a trauma cranico e in 6 casi a un'emergenza ipertensiva. In 28 casi erano presenti fattori di rischio quali diabete mellito e/o ipertensione arteriosa, la terapia anticoagulante iniziata da meno di tre mesi, mentre nei restanti 3 casi non erano presenti fattori di rischio noti. In 4 (13 %) pazienti, al momento dell'accesso in PS, vi era un valore INR superiore al range terapeutico e si può considerare quale causa scatenante l'EC. La frequenza di EC spontanea era di 4.4 casi ogni 1000 Pazienti trattati; in 6 pazienti la TAO è stata ripresa, dopo opportuno periodo di sospensione, dato l'elevato rischio trombotico e a tutt'oggi non si registrano recidive di EC. Dall'analisi dei dati emerge che l'incidenza di EC nei pazienti in TAO è del 5.9% e tutto ciò è verosimilmente legato all'elevata età media dei pazienti (84±7aa), alla presenza nel 90.3% di fattori di rischio noti e nel 38.7% di una causa scatenante l'evento; solamente nel 13% l'EC poteva associarsi ad una eccessiva coagulazione. Si può concludere che onde ridurre ulteriormente la frequenza di EC è necessario ottimizzare: la selezione dei pazienti da sottoporre a TAO con un'attenta valutazione del rapporto rischio trombotico/ rischio emorragico, il monitoraggio della terapia tramite l'utilizzo di sistemi esperti a supporto del Medico e l'educazione del paziente.

051

**CONFRONTABILITA' DEI VALORI DELL' ANTIGENE DEL FATTORE DI VON WILLEBRAND FORNITI DA DUE COAGULOMETRI AUTOMATIZZATI**L. Bressan<sup>1</sup>, M.G. Biotti<sup>1</sup>, G. De Luca<sup>2</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche ed Ematologia, A.O. Osp. di Circolo e Fondazione Macchi, Varese<sup>2</sup>Università degli Studi dell' Insubria, Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Varese

Il fattore di von Willebrand (vWF) è una plasmoproteina che media l'adesione e l'aggregazione delle piastrine alle proteine della matrice sottoendoteliale esposte a danno vascolare e stabilizza il Fattore VIII della coagulazione. Deficit di vWF provocano la malattia di von Willebrand; un eccessivo deposito di multimeri può invece provocare la formazione di trombi piastrinici.

Scopo del presente studio è valutare differenze tra i valori forniti da due sistemi analitici che utilizzano il medesimo reagente per la determinazione dell'antigene del fattore di von Willebrand (vWF:Ag).

Abbiamo considerato 212 pazienti del 2006-2007 (gruppo A) e 115 del 2008-2009 (gruppo B). I valori osservati sono stati stratificati per sesso: maschi di gruppo A (AM, n = 136), femmine di gruppo A (AF, n = 76), maschi di gruppo B (BM, n = 47) e femmine di gruppo B (BF, n = 68). I due coagulometri esaminati sono CA 7000 (Siemens Healthcare Diagnostics) per l'analisi dei campioni relativi al gruppo A e Sismex BCS (Siemens Healthcare Diagnostics) per l'analisi dei campioni relativi al gruppo B.

La significatività delle differenze è stata valutata con il test di Mann-Whitney (livello di significatività: 0,05).

Il confronto di vWF:Ag tra il gruppo AF (min = 63%; 1° quartile = 103%; mediana = 126%; 3° quartile = 158%; max = 450%) e il gruppo AM (min = 27%; 1° quartile = 88%; mediana = 118%; 3° quartile = 157%; max = 350%) non ha evidenziato differenze significative ( $p > 0,05$ ); analogamente, il confronto di vWF:Ag tra il gruppo BF (min = 16%; 1° quartile = 82%; mediana = 111%; 3° quartile = 169%; max = 350%) e il gruppo BM (min = 10%; 1° quartile = 75%; mediana = 94%; 3° quartile = 154%; max = 382%) indica che non sono presenti differenze significative ( $p > 0,05$ ).

L'accordo tra i valori di vWF:Ag dimostra che i due sistemi analitici possiedono simili caratteristiche di specificità analitica. Concludendo, i due sistemi forniscono risultati confrontabili dal punto di vista della risposta analitica e quindi possono essere indifferentemente utilizzati dal laboratorio in base alle specifiche esigenze.

052

**MISURA DELLA GENERAZIONE DI TROMBINA: VARIABILI PREANALITICHE E INTERVALLI DI RIFERIMENTO**L. Bassi<sup>1</sup>, C. Dellanoce<sup>1</sup>, O. Paoletti<sup>1</sup>, A. Zimmermann<sup>1</sup>, A. Alatri<sup>1</sup>, A. Cogrossi<sup>1</sup>, M. Stramezzi<sup>1</sup>, S. Testa<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Centro Emostasi e Trombosi, Cremona

Introduzione. La misurazione della generazione di trombina(TGA) è espressione della quantità di trombina prodotta e quindi è utilizzabile per valutare gli stati di iperipocoagulabilità.

Scopo del lavoro. Definire la precisione del metodo in uso e gli intervalli di riferimento del TGA in rapporto a diverse fasce di età, del sesso e di alcune variabili preanalitiche quali il fumo o la terapia estroprogestinica(EP).

Materiali e Metodi. La valutazione è stata eseguita con lo strumento Ceveron della ditta TECHNOCLONE a rilevazione fluorimetrica.

Sono stati valutati 120 donatori sani suddivisi per fasce di età(20-40;40-60) fumatori e non, con e senza EP.

I campioni, prelevati in plasma citratato 0.109mM, sono stati centrifugati 15'a 3000 xg. Il TGA è stato eseguito su tutti i campioni a fresco, dopo congelamento a -80°C e anche su campioni in precedenza filtrati. Tutti i campioni sono stati testati in doppio. Come controllo, ad ogni seduta è stato utilizzato un pool di plasmi normali.

Risultati. Media, SD, CV sono state calcolate in ogni gruppo. Inoltre è stata valutata la precisione nella serie (CV10.7%) e tra serie (CV12.4%) del pool di plasmi utilizzato poi come controllo di precisione. Si evidenzia il progressivo incremento della quantità di trombina prodotta (peak nM) in relazione all'età ed all'assunzione di TEP o al fumo, anche se non risultano differenze significative.

fresco non filtr

filtr/cong

non filtr/cong

E' stato valutato anche il lag time(min) e la velocity(m/min).

peak(nM) 353.0/100.0 413.7/75.5 431.7/63.3 367.7/78.9 409.6/82.7 526.5/103.4

209.4/25.5 333.7/59.3 44.8/48.6 268.1/69.6 357.4/86.6 374.2/8.5

467.7/151.5 434.7/80.8 513.2/68.6 459.4/115.9

490.5/115.3 536.2/117.8

uomini:20-40 40-60 20-40 anni donne:20-40 40-60 20-40(EP)

Conclusioni. Il TGA eseguito sia su campioni freschi che su campioni congelati non evidenzia differenze significative come pure nella popolazione sana di età compresa tra i 20 e 60 anni. E' però sensibile all'azione attivatoria del sistema emostatico secondario al fumo ed all'uso di EP.

053

**UTILITA' DELLA RICERCA DELLE MUTAZIONI DEL CYP2C9 E DEL VKORC1 TRAMITE PCR REAL TIME NEL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE**
G. Devoto<sup>1</sup>, V. Marrè<sup>1</sup>, S. Massaro<sup>1</sup>, D. Tanca<sup>1</sup>, M.Neri<sup>1</sup>, R. Ceccarelli<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi, Osp. Lavagna, ASL 4 Chiavarese, Genova

Lo scopo del presente lavoro è verificare l'applicabilità alla routine operativa della ricerca delle mutazioni del CYP2C9 e del VKORC1 tramite PCR Real Time e il rapporto costi / benefici (riduzione dell'incidenza di complicanze emorragiche) che ne può derivare. Presso il Laboratorio Analisi è operante l'Ambulatorio per il Monitoraggio del Paziente Anticoagulato (1250 Pazienti). Abbiamo selezionato 49 Pazienti che, sulla base del dosaggio farmacologico settimanale, potevano essere classificati come Iperresponder (Dose Media 6.25 mg settimana Warfarin / Acenocumarolo; N° 41) o come Iporesponder (Dose Media 90 mg settimana Warfarin N° 4 e Dose Media 45 mg settimana Acenocumarolo N° 4). Abbiamo utilizzato il Kit Fast Set Warfarin (Arrow Diagnostics) per la ricerca delle mutazioni del CYP2C9 (430 C>T (2\*), 1075 A>C (3\*)) e del VKORC1 (-1639 G>A) con applicazione dell'analisi scatter finale su RotorGene 3000. Abbiamo ottenuto la seguente distribuzione dei vari genotipi studiati: 430 (28% Eterozigosi, 72% Omozigosi Normale, 0% Omozigosi Mutato), 1075 (33% Eterozigosi, 63% Omozigosi Normale, 4% Omozigosi Mutato) e -1639 (47% Eterozigosi, 18% Omozigosi Normale, 35% Omozigosi Mutato). La storia clinica dei pazienti evidenzia, nel gruppo Iperresponder, valori d'INR elevati nella prima settimana di terapia, l'utilizzo di Vitamina K nell'80% di questi, tempi medi più lunghi per l'ottenimento della stabilizzazione della terapia, un'incidenza di complicanze emorragiche (minori/maggiori) non superiore alla media. I casi di totale omozigosi 15% appartengono ai pazienti Iporesponder. Solamente in un caso si ha una mancata corrispondenza poiché il paziente è Iperresponder. I casi Iperresponder invece mostrano tutti, con l'eccezione di 1 campione, almeno la mancanza di omozigosi per uno SNP studiato. I nostri dati dimostrano: un'ottima correlazione tra la ricerca delle mutazioni e la risposta clinica alla terapia, che i pazienti Iperresponder sono pazienti difficili, la cui gestione può richiedere la ricerca delle mutazioni CYP2C9 e VKORC1 che peraltro non trova indicazione, essendoci uno sbilanciamento tra i costi e i benefici, come ricerca di base in tutti i pazienti prima di iniziare la terapia anticoagulante orale.

054

**COMPARISON BETWEEN SILICONIZED EVACUATED GLASS TUBES AND EVACUATED PLASTIC TUBE IN PROTHROMBIN TIME AND ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME ASSAY IN NORMAL SUBJECTS, PATIENTS ON ORAL ANTICOAGULANT THERAPY AND PATIENTS WITH UNFRACTIONED HEPARIN THER**
C.G. Villa<sup>1</sup>, G. D'Angelo<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Chimica-Clinica, Ematologia e Microbiologia, Azienda Ospedaliera San Antonio Abate, Gallarate (VA)

The aim of the study was to consider if different tubes influence significantly the main coagulation tests: PT and aPTT. We evaluated two types of tubes: Glass vs Plastic. The comparison was carried out between four types of evacuated tubes: 1) BD (siliconized glass); 2) Greiner(plastic); 3) Terumo(plastic); 4) Kima (plastic). We examined a cohort of subjects belonging to three classes: 1) 20 females and 20 males, apparently healthy subjects, age between 9 and 91 years, median 51; 2) 12 females and 28 males patients on oral anticoagulants therapy (OAT), age between 36 and 87 years, median 69; 3) 17 patients, 12 males and 5 females, age between 32 and 88 years, median 64, treated with unfractionated heparin (UFH). According to aPTT ratio, 30 aPTT tests were performed to monitor UFH therapy. The study was aimed to assess whether, in relation to the types of tubes used, there were statistically significant differences between PT and aPTT tests within the three classes of subjects. For the aPTT test in normal subjects the analysis of variance showed no statistically significant differences ( $\alpha = 0.05$   $F = 2.5$  vs  $F_{crit} = 2.6$ ), but for the PT test there were differences statistically significant ( $F = 20.4$  vs.  $F_{crit} = 2.6$ ). For the normal subjects, we also performed the analysis of t student who showed significant differences between the three plastic tubes compared to the glass tube. The plastic tube of Terumo showed a discrete correlation with BD, while the correlation Kima vs BD was not satisfactory. For patients on OAT, the PT test showed a clear statistically significant difference among the four types of tubes ( $\alpha = 0.05$   $F = 11.9$  vs.  $F_{crit} = 2.66$ ). Furthermore, we observed a discrete correlation regarding Terumo vs BD ( $R = 0.97$ ), not as satisfactory is the correlation regarding Kima vs BD ( $R = 0.87$ ). For aPTT test in patients treated with UFH the analysis of variance showed no statistically significant differences ( $\alpha = 0.05$ ,  $F = 0.11$  vs  $F_{crit} = 2.68$ ). Our study show that, according to the material used, in healthy subjects and patients on OAT there is statistically significant difference only on the PT test, with an important negative impact in patients on OAT.

## References

Lawrence JB. Preanalytical variables in the coagulation laboratory. Lab Med 2003;1:49-57

055

**WHY DO WE EVALUATE PT AND PTT BEFORE DELIVERY?**

R. Maiavacca<sup>2</sup>, E. Biguzzi<sup>1</sup>, F. Franchi<sup>1</sup>, C. Palmucci<sup>2</sup>, D. Asti<sup>2</sup>, O. Morabito<sup>2</sup>, E. Magni<sup>2</sup>, P. Leggeri<sup>2</sup>, B. Acaia<sup>3</sup>, T. Radaelli<sup>3</sup>, P.M. Mannucci<sup>1</sup>, E. Torresani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A. Bianchi Bonomi Haemophilia and Thrombosis Center, Department of Medicine and Medical Specialties

<sup>2</sup>Biochemical Analysis Laboratory

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Milan, IRCCS Maggiore Hospital, Mangiagalli and Regina Elena Foundation, Milano, Italy

**Background.** Unselected coagulation testing is sometime used prior to surgery to evaluate the bleeding risk. It is known that normal tests do not exclude some hemorrhagic disorders and that abnormal tests are not necessarily associated with an increased hemorrhagic risk. More specifically, in our institution, anaesthetists not only evaluate the bleeding history in all women undergoing peri-partum analgesia by epidural catheter, they also require pre-partum evaluation of prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and platelet count. In the framework of a prospective study evaluating risk factors for post-partum haemorrhage, results of unselected pre-partum coagulation screening were recorded in all women with vaginal delivery, to determine whether or not these tests predict excessive bleeding at parturition.

**Methods.** Enrolment criteria: women undergoing analgesia for vaginal delivery. Exclusion criteria: delivery before 37th week of gestation, twin pregnancy, caesarean section. Coagulation tests were performed in different laboratories and registered as normal or abnormal. Post-partum haemorrhage was defined as bleeding >500ml (measured in a graduated bag, placed under the women buttocks after the newborn delivery).

**Results.** 2158 women, undergoing partum analgesia for vaginal delivery, were enrolled between July 2007 and January 2009. Abnormal coagulation tests were found in 26 (1.2%) women (9 for PT and 16 for APTT). Post-partum haemorrhage occurred in 501 women (30%). The negative predictive value was 76% for PT and APTT, while the positive predictive value was 55% for PT, 18% for APTT and 34% for PT or APTT considered together.

**Discussion.** This study shows low positive and negative predictive values of PT and APTT performed before delivery. Even in the presence of abnormal tests, no further tests were performed nor the anesthesiological approach was modified. The real usefulness of these tests in this setting appears uncertain.

056

**RUOLO DELLA DETERMINAZIONE DEI FATTORI DELLA COAGULAZIONE NELLA DIAGNOSI DI SEPSI GRAVE E SHOCK SETTICO**

P. Carraro<sup>1</sup>, L. Di Fedè<sup>1</sup>, H. Afshar<sup>1</sup>, S. Boraso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera e Azienda ULSS 16, Padova

<sup>2</sup>Terapia Intensiva, Ospedale Sant'Antonio, Azienda ULSS 16 Padova

La condizione clinica di sepsi grave o di shock settico è accompagnata da un costante coinvolgimento della funzione coagulativa, per un meccanismo di consumo di fattori indotto dallo stato infiammatorio. Un problema diagnostico di grande rilievo nella gestione del paziente critico riguarda la capacità di discriminare se una alterazione dei test coagulativi globali sia conseguenza di un'attivazione (consumo) o sia piuttosto l'espressione di una insufficienza epatica.

**Pazienti e Metodi.** Sono stati considerati casi consecutivi di pazienti che venivano ricoverati in Terapia Intensiva con alterazioni dei test coagulativi pur in assenza di trattamenti anticoagulanti. Sono stati selezionati 12 casi di sepsi grave o shock settico e 11 che si sono rivelati insufficienze epatiche. Le diagnosi sono state poste a fine ricovero con criteri clinici e di laboratorio. A tutti i pazienti sono stati eseguiti test coagulativi di routine ed alcune aliquote di plasma citratato sono state immediatamente congelate a -30°C per la determinazione di singoli fattori. Con metodi coagulativi sono state determinate le concentrazioni di fattori V, VII, VIII, X, XI e XII sui prelievi ottenuti in prima giornata dall'osservazione. È stato applicato il test non parametrico di Wilcoxon per verificare se fin dalla prima alterazione di PT o aPTT vi era la capacità di identificare i soggetti che sviluppavano una sepsi.

**Risultati.** I test globali non erano significativamente diversi nei due gruppi. I dosaggi di fattori che hanno ottenuto una significatività statistica sono stati il fattore VIII ( $p = 0.01$ ), il fattore X ( $p = 0.0008$ ). Anche il rapporto fattore VIII/fattore X mostrava una significatività, ma comunque inferiore a quella del fattore X da solo. Da un punto di vista diagnostico le caratteristiche del fattore X al cut-off di 40% sono risultate: sensibilità 91.7%, specificità 90.1%, LR+ 9.26, LR- 0.09.

**Conclusioni.** La determinazione dell'attività del fattore X in pazienti di terapia intensiva con un'alterazione spontanea di PT o aPTT può distinguere i soggetti con un'evoluzione verso la sepsi grave o shock settico, in caso sia marcatamente ridotta.

**Bibliografia**

Levi M. The coagulant response in sepsis. Clin Chest Med. 2008 Dec;29(4):627-42.

057

**IL DOSAGGIO DEL D-DIMERO DURANTE LA GRAVIDANZA**

F.M. Biella<sup>1</sup>, B. Cremonesi<sup>1</sup>, A. Cappellani<sup>1</sup>, G. Limonta<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio*

**Introduzione.** Il D-dimero (D-d) è un prodotto di degradazione della fibrina stabilizzata. In condizioni fisiologiche la sua concentrazione dipende dall'attivazione della coagulazione e dal controllo fibrinolitico. Il livello di D-d risulta aumentato in numerose condizioni fisiologiche e patologiche, ma il suo dosaggio viene principalmente utilizzato nella diagnosi di esclusione di trombosi venosa profonda o embolia polmonare (TEV) grazie all'elevato valore predittivo negativo che il test presenta utilizzando il valore soglia di 500 ng/mL ed in gravidanza per la conferma di complicanze gestazionali come TEV, preeclampsia e sindrome HELLP. Tuttavia in gravidanza si rileva normalmente un progressivo incremento della concentrazione di D-d dovuto allo stato di ipercoagulabilità che caratterizza questa condizione. Emerge quindi la necessità di stabilire i limiti di riferimento per trimestre di gravidanza per interpretare i risultati del dosaggio del D-d nel sospetto di complicanze gravidiche.

Lo scopo del lavoro è quello di valutare le concentrazioni di D-dimero durante la gravidanza e al momento del parto per definirne i valori di riferimento.

**Materiali e Metodi.** La popolazione in studio è costituita da 229 donne gravidе senza complicanze gestazionali, a cui sono state misurate le concentrazioni di D-dimero in diversi momenti della gestazione (63 nel primo trimestre, 53 nel secondo, 59 nel terzo e 54 al termine), con metodo immunoturbidimetrico potenziato al lattice (Innovance D-Dimer, Siemens).

**Risultati.** Nella popolazione studiata si osserva un progressivo aumento delle concentrazioni di D-d dall'inizio alla fine della gravidanza con un valore mediano di 446 ng/mL nel I trimestre (2,5° e 97,5° percentile: 224-1149), di 838 ng/mL nel II (403-1876), di 1303 ng/mL nel III (496-3529) e di 1381 ng/mL al termine (483-3625).

**Conclusioni.** A causa dell'incremento fisiologico del D-dimero a cui si assiste durante la gravidanza normale i valori di riferimento risultano differenti rispetto a quelli della popolazione generale. La valutazione delle concentrazioni di D-d è necessaria sia nella diagnosi che nel monitoraggio degli eventi patologici che possono complicare la gravidanza.

**Bibliografia**

Kline JA et al. *Clinical Chemistry* 2005;51:825-829.

058

**INTERFERENCE OF A REGULAR STANDARDIZED MEAL ON ROUTINE COAGULATION TESTING**

G. Lippi<sup>1</sup>, G.L. Salvagno<sup>1</sup>, G. Lima-Oliveira<sup>2</sup>, M. Gelati<sup>1</sup>, M. Montagnana<sup>1</sup>, E. Danese<sup>1</sup>, G. Picheth<sup>3</sup>, A. Duarte<sup>2</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Sezione di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Osp. Policlinico G.B. Rossi, Verona, Italy*

<sup>2</sup>*University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

<sup>3</sup>*Federal University of Parana, Curitiba-PR, Brazil*

**Background.** Patient-related factors, such as physical exercise, stress and fasting status influence the reliability of laboratory testing. However, no clear indications about fasting requirements exist for routine and specific coagulation testing, nor the influence of meals were previously assessed.

**Methods.** Venous blood specimens were drawn in the morning from 17 fasting volunteers. The subjects ate a regular, standardized meal, contain carbohydrates, protein and lipids (563 Kcal) in 10 min. Sequential venipunctures were performed before the meal and 1, 2 and 4 hours later. Blood was always collected by a single and expert phlebotomist, by venipuncture with 20 G straight needles, directly into 3.6-ml siliconized evacuated tubes containing 0.109 mol/l buffered trisodium citrate. Each phase of the sample collection was accurately standardized, including the use of needles and vacuum tubes of the same lot. We assayed activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), Fibrinogen, protein C, protein S and antithrombin on the ACL TOP (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Significance of differences between samples was assessed by paired Student's t-test. The level of statistical significance was set at p<0.05. The biases following 1, 2 and 4 hours after the meal were compared with the current desirable quality specifications for bias, derived from biologic variation.

**Results.** Statistically significant differences exceeded the analytical quality specifications for desirable bias only for aPTT after 2 h. No other significant biases could be recorded.

**Conclusions.** Specimens collected after a regular meal might still be suitable to achieve results of routine coagulation testing comprised within the analytical quality specifications for desirable bias, except for aPTT. These findings could be relevant for evaluation of stat-testing in the emergency department.

**Reference**

Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:720-7.

059

**FMEA/FMECA: A PROCESS'S ANALYSIS**

R. Locont<sup>1</sup>, A. Casalino<sup>2</sup>, E. Picardi<sup>4</sup>, C. Nocera<sup>3</sup>, C. De Simone<sup>5</sup>, M. Coppola<sup>1</sup>, A. Pizzella<sup>1</sup>, M. D'Amora<sup>6</sup>, C. Ruotolo<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Servizio Controllo Qualità ASL NA1 Centro

<sup>2</sup>S.I.M.T. Osp. San Paolo ASL NA1 Centro

<sup>3</sup>S.I.M.T. Osp. San G. Bosco ASL NA1 Centro

<sup>4</sup>S.I.M.T. Osp. Pellegrini ASL NA1 Centro

<sup>5</sup>S.I.M.T. Osp. S.M. del Loreto ASL NA1 Centro

<sup>6</sup>Dip. Centrale Medicina di Laboratorio ASL NA1 Centro

<sup>7</sup>U.G.R. ASL NA1 Centro

Introduction. The clinic risk group of ASL NA1 Center, takes care about the implementation of procedures to enforce Ministerial Recommendations, concerning the reduction and prevention of sentinel events. Great attention has been paid to recommendation 5: prevention of transfusional reaction by AB0 incompatibility.

Objectives. Establishing action's priority to prevent mistakes about unique identification of patient/blood sample/blood's sack/ blood's component

Methodology. The methodology include: Registration Not Conformity; Definition critical process to analyse; Definitions of multidisciplinary team; Process partition; Evaluation of both undertaken activities and eventual mistakes, including its impact on the patient; Evaluation of context and barriers; Creation of tables to checking, detecting and evaluating mistakes and its severity damages; Priority risk index (IPR) calculation; Corrective action and control.

Research Results. From the analysis is established of: 1. In the Hospital's Operative Unit it needs to instruct and share procedures in order to: correct identification the test blood (IPR350/630); correct identification patient during the test blood, specially in case of unconscious patient (IPR350/630); Verify and check request and correct execution of collecting both test blood and patient identification, before sending to SIMT (IPR900); The correct assignment of the blood e blood's component for the transfusion. 2. Top Management and the Clinic Risk Group: Activated iter to implement procedures and to buy barrier for error reduction (IPR630): System BAR-CODE, Patient identification bracelet, Samples/request transport system.

Conclusions. Adopted activities: formative protocols implemented; elaboration and controlled distribution of 3 procedures (requirement Health Ministry N°5 recommendation and DM3/3/2005 transfusional safety); Elaboration and controlled distribution of documents records-documents that provide objective evidence of activities performed or results achieved to (to document traceability, nonconformity, objective and the indicator, and to provide evidence of verification, preventive action and corrective action and report. The FMEA/FMECA methodology application was a moment of multidisciplinary confront that allowed the assessment of various issues in a broader vision.

060

**APPLICAZIONE DELLA FAILURE MODE AND EFFECT ANALYSIS IN MEDICINA DI LABORATORIO: RISULTATI DI UN ESPERIENZA**

L. Sciacovelli<sup>1</sup>, S. Altinier<sup>2</sup>, M.G. Epifani<sup>2</sup>, F. Navaglia<sup>2</sup>, E. Piva<sup>2</sup>, C. Pozzato<sup>2</sup>, R. Venturini<sup>2</sup>, M. Farina<sup>3</sup>, M.L. Chiozza<sup>4</sup>, M. Plebani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

<sup>2</sup>Dip. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova

<sup>3</sup>EmmEffe, Management e Formazione, Milano

<sup>4</sup>Servizio Qualità, Azienda Ospedale-Università, Padova

La Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) è un sistema di individuazione dei rischi ad approccio preventivo, che parte dal presupposto che, indipendentemente dal livello di conoscenza e di attenzione, possono crearsi situazioni in cui gli errori sono possibili o probabili. L'oggetto in analisi non è l'evento avverso o il quasi evento bensì il processo così come si svolge in routine; è quindi un sistema che può essere applicato indipendentemente dal verificarsi di un evento e va alla ricerca non di ciò che è accaduto, ma di ciò che potrebbe accadere se si verificasse un errore. Scopo di questo lavoro è presentare il progetto di applicazione della FMEA a 6 processi della fase pre-analitica. La metodologia comprende le seguenti fasi: scelta dei processi; costituzione dei gruppi di lavoro; analisi dei processi; identificazione dei potenziali errori; valutazione delle possibili conseguenze; individuazione delle possibili cause; stima della gravità, probabilità, rilevabilità; calcolo dell'indice di rischio (IR); definizione delle azioni di miglioramento; valutazione dell'efficacia degli interventi. L'approccio per l'individuazione delle cause di errore impone un'analisi delle condizioni che hanno favorito l'accadere dell'evento, delle difese che hanno fallito e delle condizioni che debbano essere messe in atto per evitare il ripetersi, piuttosto che l'identificazione di colui che ha causato l'errore. Attualmente le fasi di applicazione delle azioni di miglioramento e di rivalutazione dell'IR sono in via di conclusione. L'analisi dei processi ha riportato i seguenti IR complessivi: Prelievi ambulatoriali, 566 (media su due sedi); Prelievo ed invio campioni dai reparti interni all'Azienda, 279 (media su 5 reparti); Prelievo ed invio campioni dai punti prelievo distrettuali, 425 (media su 2 sedi); Accettazione richieste da altri Ospedali ed Enti, 542; Gestione dei campioni a refertazione prioritaria concordata, 747; Accettazione e smistamento campioni, 1517. L'utilizzo della FMEA per la gestione del rischio clinico si è dimostrato uno strumento di grande stimolo per approfondire ed applicare l'approccio preventivo e soprattutto per stimolare il coinvolgimento consapevole del personale quale elemento vincente per la risoluzione dei problemi.

061

**UTILIZZO DI UN ALGORITMO MATEMATICO PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DERIVANTE DALL'ESPOSIZIONE AD AGENTI O COMPOSTI CHIMICI PERICOLOSI PER IL PERSONALE DI UN LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA**

A.E. Marchese<sup>1</sup>, M. Sciacca<sup>1</sup>, V. Taschetta<sup>1</sup>, V. Frontini<sup>1</sup>, G. Di Dio<sup>1</sup>, A. Paladino<sup>1</sup>, F. Vinci<sup>1</sup>, N. Zagami<sup>1</sup>, G. Celano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica, Osp. S. Bambino, Catania

<sup>2</sup>Dip. Ingegneria Industriale e Meccanica, Università Catania

**Scopi/Obiettivi.** In alternativa alla misurazione dell'agente chimico è possibile valutare il rischio con algoritmi che assegnano valori numerici a più fattori o parametri che intervengono nella determinazione del rischio, pesando, per ognuno di essi, l'importanza assoluta e reciproca sul risultato valutativo finale. La valutazione del rischio (R) derivante dall'esposizione ad agenti pericolosi è data dal prodotto del pericolo P per l'esposizione E. Il pericolo P identificato con le frasi di rischio R (Direttive Europee 67/548/CEE e successive modifiche e integrazioni) ed il grado di esposizione E dipendono da: quantità agente chimico impiegato o prodotto, modalità di impiego, frequenza all'esposizione e DPI.

**Scopo del lavoro** è stato la valutazione dell'applicabilità di un algoritmo all'area plasma per estendere tutto il procedimento alle restanti aree lavorative implementando così la procedura di prevenzione e protezione relativa al rischio chimico.

**Metodologia.** L'algoritmo adottato è stato quello dell'Istituto di Igiene e Servizio Prevenzione e Protezione (SPP) dell'Università Cattolica di Roma. I parametri per la quantificazione del rischio sono stati: stato fisico, pericolosità del composto, quantità manipolata, tempo di manipolazione, DPI ed esposizione diretta o indiretta. Le variabili scelte sono state suddivise in quattro fasce, ad ognuna delle quali è stato assegnato un coefficiente moltiplicativo con valore crescente in base al rischio.

Il calcolo del rischio per l'operatore è stato fatto moltiplicando i coefficienti di rischio associati ai parametri scelti. Il livello di rischio è stato suddiviso secondo un range predefinito in: medio/alto, medio, medio/basso, moderato.

**Risultati.** I risultati ottenuti hanno mostrato che il livello di rischio complessivo del Personale del Settore di Coagulazione è medio/basso.

**Conclusione.** L'utilizzo di un algoritmo per la valutazione del rischio è realizzabile in ambiti dove il sistema di qualità è ben sviluppato e rappresenta un importante ausilio per il SPP che deve fornire protocolli di sorveglianza specifici per ogni esposto.

062

**ANALISI DEL SEDIMENTO URINARIO MEDIANTE ANALIZZATORE AUTOMATICO SEDIMAX**

S. Besana<sup>1</sup>, A. Fausciana<sup>1</sup>, E. Leonardi<sup>1</sup>, V. Sponchiado<sup>1</sup>, D. Vasquez<sup>1</sup>, P.L. Tramacere<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi A.O. di Desio e Vimercate, P.O. di Carate Brianza

**Introduzione e Scopo.** L'esame delle urine e del sedimento urinario (SU) fornisce utili informazioni per l'inquadramento e la valutazione di malattie renali e delle vie urinarie o di alcune malattie metaboliche non direttamente correlate a patologie renali. L'analisi al microscopio ottico (m.o) del SU presenta però una variabilità tra operatori che potrebbe essere ridotta dall'utilizzo di lettori automatici.

**Scopo del lavoro.** Valutare le prestazioni analitiche dello strumento SediMax (Menarini Diagnostics) nella lettura automatica del SU misurando Sensibilità (Sen), Specificità (Spec), Valore Predittivo Positivo (VPP) e Negativo (VPN) dei principali elementi del SU.

**Materiali e Metodi.** Sono stati analizzati 950 campioni di urina giunti consecutivamente al nostro laboratorio provenienti dai reparti di degenza e dai punti prelievi ambulatoriali sul territorio.

L'analisi del SU è stata eseguita in doppio con lettura al m.o. e lettura automatica dei 15 fotogrammi prodotti per ogni campione.

La valutazione di Sen, Spec, VPP, VPN, è stata effettuata per Globuli rossi (GR), Globuli bianchi (GB), Batteri (BAC), Cellule squamose epiteliali (EPI), Cristalli (CRY).

**Risultati e Conclusioni.** L'analisi dei risultati mostra complessivamente per il SediMax una Sen. del 91% e una Spec. dell'88,5%. Ottimi risultano i valori di Spec. e VPN (compresi tra 92%-98%) per ciascuno degli elementi considerati. Buoni risultati di Sen. e VPP si osservano per GR, GB ed EPI (Sen. compresa tra 85%-92%; VPP tra 86%-97%). Risultati più critici si osservano invece per BAC e CRY (rispettivamente Sen. di 75% e 68% e VPP di 84% e 77%).

Problematico risulta il riconoscimento dei cilindri (le EPI vengono a volte classificate come cilindri jalini), determinando così una bassa Spec. (<70%); non è stato possibile valutare la Sen. relativa ai cilindri per la scarsa numerosità di campioni patologici. Al tal fine sarebbe necessaria l'analisi di campioni selezionati provenienti da reparti quali dialisi e nefrologia.

Molto utile risulta invece l'immagine a campo intero dei fotogrammi del SU per la valutazione complessiva del campione e degli eventuali elementi non riconosciuti dallo strumento.

**Bibliografia**

Ottiger C, et al. Ther Umsch. 2008 Sep;65(9):503-11. Review.

063

**IRITIRO DEI REFERTI ON LINE: SODDISFAZIONE DELL'UTENTE E MIGLIORAMENTO DEL SERVIZIO**

I. Pavan<sup>1</sup>, G. Vecchiato<sup>1</sup>, A. D'Osualdo<sup>1</sup>, M. Pignataro<sup>1</sup>, A. Romice<sup>1</sup>, L. Sciacovelli<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova

Nell'ambito del progetto di continuo miglioramento dei servizi offerti all'utente, il nostro Servizio ha messo a disposizione uno sportello telematico che consente di visualizzare tramite connessione sicura su internet il proprio referto medico.

Scopo di questo lavoro è dimostrare il miglioramento ottenuto presso la nostra struttura dall'introduzione di questo servizio.

E' stata calcolata la percentuale di ritiri effettuata mediante sportello telematico nei mesi gennaio-luglio 2009 e sono stati valutati i tempi di attesa relativamente al ritiro referti. I risultati raccolti evidenziano un continuo incremento del ritiro referti mediante sportello telematico dal mese di gennaio (4,02%) al mese di luglio (19,44%). I tempi di attesa per il ritiro dei referti valutati relativamente all'analogo periodo del 2008 risultano diminuiti di circa il 30% (da 12 minuti a 8 minuti). Inoltre è da evidenziare che questa modalità di ritiro porta all'azzeramento dell'errore relativo all'attività manuale di imbustamento dei referti che, per l'anno 2008, è risultato pari a 1,67% per problemi dovuti a ritardo di spedizione (0,51%), assemblaggio di allegati (0,20%) o di referti provenienti da altri servizi (0,96%).

I risultati dimostrano che questa modalità di refertazione è stata positivamente accolta dall'utente. Si offre la possibilità di ricevere il referto pochi istanti dopo la redazione con la massima tutela della sicurezza e riservatezza delle informazioni: l'autenticazione infatti avviene mediante firma digitale, trasmissione cifrata e la ricezione è possibile esclusivamente alle persone autorizzate. Gli spostamenti verso la struttura sono ridotti e limitati solamente a quelli necessari allo svolgimento degli esami diagnostici, consentendo all'utente di evitare inutili perdite di tempo; sono inoltre ridotti i tempi di attesa in ambulatorio per chi ritira il referto in forma cartacea. Infine, la semplificazione delle procedure amministrative dovute alla riduzione dei passaggi intermedi di stampa ed assemblaggio dei referti, migliora l'efficienza organizzativa interna e riduce i possibili errori dovuti alla gestione manuale.

064

**LA VARIABILITÀ BIOLOGICA NEL CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO**

V. Proserpio<sup>1</sup>, R. Falbo<sup>1</sup>, F. Pozzi<sup>1</sup>, P. Mocarrelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio, Desio, MB

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale (DIMS), Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano Bicocca, MB

Introduzione. Le specifiche di qualità di un esame di laboratorio rappresentano la massima variazione accettabile che non comprometta l'interpretazione clinica dei risultati. La Consensus Conference di Stoccolma, ha indicato i criteri accettabili per stabilire le specifiche di qualità; tra essi, il più utilizzato è quello basato sulla variabilità biologica (1).

Scopo. Migliorare il sistema di Controllo di Qualità in uso nel nostro laboratorio, integrandolo con i dati relativi all'Errore Totale Massimo Accettabile (ET<sub>a</sub>), calcolato in base alla variabilità biologica.

Materiali e Metodi. I risultati del Controllo di Qualità Interno (CQI) sono analizzati in tempo reale con l'algoritmo "Multiregole di Westgard" e sono visualizzabili sul Portale della Qualità del laboratorio. I dati sono riassunti in un cruscotto che mostra, per ogni analita, lo stato di accettazione o rifiuto in base alle regole di Westgard, con la possibilità di accedere ai dettagli su carte di Levey-Jennings. In questo cruscotto sono state inserite anche le informazioni relative alla situazione dei dati di CQI rispetto all'ET<sub>a</sub>, i cui valori sono stati calcolati in accordo con Ricos (1).

Risultati e Conclusioni. L'introduzione dell'ET<sub>a</sub> nel Controllo di Qualità del settore Biochimica del nostro laboratorio ha evidenziato un miglioramento nella gestione del sistema. La possibilità di valutare i risultati del CQI con due sistemi di riferimento (Westgard ed ET<sub>a</sub>) garantisce maggior flessibilità nella gestione delle situazioni in cui, pur violando Westgard, non si superano i limiti dettati dall'ET<sub>a</sub>. In questi casi, gli interventi di manutenzione strumentale e di calibrazione vengono effettuati "off line", assicurando il mantenimento di un sistema efficiente e sotto controllo, e migliorando i tempi di risposta dei campioni.

Bibliografia

1. Ricos C. et al. Scand J Lab Invest 1999;59:491-500.

065

### I PROGRAMMI DI VEQ E LA DEFINIZIONE DELL'OBIETTIVO ANALITICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'EMOGLOBINA FECALE

L. Zardo<sup>1</sup>, L. Sciacovelli<sup>1</sup>, S. Secchiero<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Lo screening per il cancro coloretale è raccomandato sulla base di evidenze dell'efficacia della ricerca del sangue occulto (FOB) nella riduzione della mortalità, quindi è indispensabile ottimizzare le performance dei test per garantire massima omogeneità analitica. In questo contesto il Centro di Ricerca Biomedica (CRB) ha implementato, nel 2006, uno schema di VEQ per FOB.

Scopo del lavoro è definire l'obiettivo analitico per la determinazione del FOB sulla base dei dati di VEQ, dal momento che non esistono studi di variabilità biologica o di outcome clinico, e di valutare la concordanza dei laboratori nella classificazione dei campioni in termini di pos/neg, sulla base delle risposte qualitative fornite dai partecipanti. Per definire l'obiettivo analitico è stato calcolato il CV% medio dei risultati forniti dai partecipanti alla VEQ nei cicli 2006-2008 in 18 campioni di controllo, risultante pari a 11.2% (min 7.0, max 16.1). Il CRB ha assunto questo dato come indice dello stato dell'arte nella determinazione del FOB ed ha posto pari a 12% l'obiettivo analitico per la valutazione delle prestazioni. Per valutare la concordanza fra i laboratori nella classificazione dei campioni sono state analizzate le risposte (pos/neg) fornite dai partecipanti in 20 campioni di controllo (cicli 2006-2009). Fra gli utilizzatori di sistemi quantitativi la concordanza è risultata: assoluta nei campioni nettamente neg o pos, mediamente del 95% per concentrazioni comprese fra 120 e 180 ng/mL, più bassa (92-77%) per concentrazioni fra 70 e 120 ng/mL. La discordanza osservata è dovuta non solo alla variabilità analitica ma anche al cutoff utilizzato, infatti si è osservato che, se tutti i laboratori utilizzassero lo stesso cutoff (100 ng/mL), la concordanza delle risposte aumenterebbe mediamente del 5%, fino al 10% nei campioni fra i 70 e 100 ng/mL.

I dati dimostrano che i Programmi di VEQ risultano uno strumento essenziale per definire lo stato dell'arte da utilizzare come obiettivo analitico laddove non esistano altri riferimenti e che, per aumentare la concordanza nella classificazione dei campioni, è necessario, oltre che migliorare precisione e accuratezza, che si adottino valori di cutoff adeguati ed in linea con le raccomandazioni esistenti.

066

### VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITA' (VEQ) PER L'ESAME CHIMICO FISICO DELLE URINE: RISULTATI DEL PROGRAMMA ITALIANO

S. Secchiero<sup>1</sup>, L. Sciacovelli<sup>1</sup>, L. Zardo<sup>1</sup>, G.B. Fogazzi<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)<sup>2</sup>U.O. di Nefrologia, Dialisi, Trapianto, Fondazione IRCCS, Osp. Maggiore-Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Il Programma "Urinalysis Performance", gestito dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB), è nato nel 2000 con il patrocinio di AIPaC, SIBioC, SIMeL e SIN allo scopo di fornire uno strumento di educazione continua sull'esame chimico-fisico e microscopico dell'urina. Lo schema prevede l'utilizzo di immagini per l'identificazione degli elementi del sedimento e di campioni liofili (3 esercizi) per l'analisi chimico-fisica. In questo lavoro viene descritta la parte relativa all'esame chimico-fisico.

I 350 partecipanti inseriscono i risultati in una maschera del sito web del CRB, predisposta con la scala di lettura propria della striscia utilizzata.

I risultati sono elaborati per sistema diagnostico ed il rapporto prevede, per ogni costituente, sia la distribuzione di frequenza dei risultati relativi a tutte le strisce della ditta fornitrice che la distribuzione di frequenza di tutti i risultati su scala normalizzata, es: Glucosio = Neg, 30-50, 70-100, 150-250, 300-500, >1000 mg/dL.

Scopo. Verificare la concordanza dei risultati tra laboratori.

Materiali. Sono stati analizzati i risultati relativi ai 6 campioni del ciclo 2008 con numerosità media per esercizio = 280 e per striscia: Siemens Atlas=34, Multistix=15; Roche Urisys=30; Menarini Uriflet=195, Aution=12.

Risultati. % media di risposte uguali: pH= 74.3 (range 62.7-92.6); Densità= 79.1 (59.8-90.6); Glucosio= 72.3 (57.4-99.6); Proteine= 75.9 (59.7-91.5); Emoglobina= 78.8 (56.7-100); Chetoni.= 78.3 (58.4-99.6); Esterasi Leucocitaria= 72.1 (44.6-96.0); Nitriti= 89.3 (61.8-100).

Discussione. Mediamente più del 72% dei partecipanti fornisce risposte comprese nella stessa classe di valori, indipendentemente dalla striscia utilizzata. Il CRB avvisa i lab. con risultati che si discostano notevolmente da quello più frequente ottenuto con la stessa striscia reattiva. Pertanto, anche se non viene espresso un vero e proprio giudizio sulla prestazione analitica, questo Programma VEQ può essere un valido aiuto per tenere sotto controllo l'esame chimico-fisico delle urine. Inoltre, può contribuire alla standardizzazione, es. nella refertazione dell'emoglobina (mg/dL invece di Ery/ $\mu$ L) e a diffondere l'utilità di nuovi parametri, es. il rapp. proteine/creatinina.

Bibliografia

CLSI. Urinalysis; GP16-A3, 2009;29:4.

067

**VEQ PROLARIT BIOCHIMICA CLINICA. UTILIZZO DI VALORI OTTENUTI CON METODO DI RIFERIMENTO PER SODIO E POTASSIO NELLA VALUTAZIONE DEI RISULTATI**E. Guerra<sup>1</sup>, A. Carobene<sup>1</sup>, F. Ceriotti<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Standardizzazione, Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A., Milano; www.prolarit.it

I programmi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) PROLARIT, distribuiti da Bio-Rad Laboratories, forniscono per alcuni analiti valori target ottenuti con metodi di riferimento. Finora la valutazione dei risultati è stata effettuata calcolando il bias% tra il singolo risultato e la media di consenso dei laboratori con lo stesso principio analitico. Scopo del lavoro è quello di verificare la possibilità di valutare i risultati utilizzando per Sodio(Na) e Potassio(K) i valori ottenuti con metodo di riferimento<sup>(1)</sup>.

Sono stati utilizzati i risultati dei 433 laboratori partecipanti alla VEQ di Biochimica del 2008 su 12 sieri liofilici con valore assegnato con metodo di riferimento.

Per ogni singolo risultato è stato calcolato sia l'ET<sub>CM</sub>% (bias tra risultato e media di consenso) sia l'ET<sub>RM</sub>% (bias rispetto al valore di riferimento). Per ogni gruppo di metodo si è calcolata la % dei laboratori il cui ET risultava essere entro i limiti di accettabilità (ETa =2.5% per Na; 5.8% per K) con i due approcci di calcolo.

Risultati:

Potenzimetria diretta Na: mediana delle % dei ET<sub>CM</sub>% entro i limiti sui 12 materiali:64%; ET<sub>RM</sub>:63%; K: ET<sub>CM</sub>:81%; ET<sub>RM</sub>:79%.

Potenzimetria indiretta Na: ET<sub>CM</sub>:69%; ET<sub>RM</sub>:67%; K: ET<sub>CM</sub>:88%; ET<sub>RM</sub>:87%.

Fotometria a fiamma Na: ET<sub>CM</sub>:52%; ET<sub>RM</sub>:51%; K: ET<sub>CM</sub>:69%; ET<sub>RM</sub>:68%.

Dry chemistry Vitros Na: ET<sub>CM</sub>:75%; ET<sub>RM</sub>:64%; K: ET<sub>CM</sub>:86%; ET<sub>RM</sub>:81%.

IMT Dimension Na: ET<sub>CM</sub>:61%; ET<sub>RM</sub>:64%; K: ET<sub>CM</sub>:78%; ET<sub>RM</sub>:78%.

Per il gruppo Vitros del Na le % dei risultati entro i limiti calcolate con i due approcci differiscono del 10%. La media di consenso del gruppo Vitros ha una sovrastima media dell'1% rispetto ai valori ottenuti con metodo di riferimento. Questa differenza può essere attribuibile o ad un problema di inaccuracy del sistema Vitros, o ad un problema di commutabilità dei materiali in questo confronto. Le medie degli altri gruppi di metodo sono praticamente sovrapponibili ai valori di riferimento così come le % dei laboratori entro i limiti di accettabilità calcolate con i due approcci.

In conclusione i risultati ottenuti ci consentono di utilizzare per la valutazione dei laboratori i valori ottenuti con il metodo di riferimento.

<sup>(1)</sup>A reference Method for the determination of Sodium and of Potassium in serum (NBS 260-60;NBS260-63)

068

**VALUTAZIONE DELL'APPROPRIATEZZA DELLE RICHIESTE: RISULTATI DI UN'ESPERIENZA**I. Pavan<sup>1</sup>, L. Sciacovelli<sup>2</sup>, E. Piva<sup>1</sup>, D. Basso<sup>1</sup>, A. D'Osualdo<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Ospedale-Università, Padova<sup>2</sup>Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Il concetto di appropriatezza in medicina di laboratorio coinvolge l'intero processo diagnostico, dalla richiesta del test all'interpretazione del risultato. Tuttavia, la valutazione dell'appropriatezza da parte dei professionisti di laboratorio è piuttosto complessa poiché manca la conoscenza della storia clinica del paziente ed è spesso difficile la contestuale comunicazione con il medico curante.

Questo lavoro riporta i risultati dell'esperienza effettuata presso il nostro laboratorio relativamente alla valutazione delle richieste dei pazienti ambulatoriali mediante l'utilizzo di due indicatori di qualità: numero di richieste riportanti il quesito clinico; numero di test appropriati in relazione al quesito clinico. L'analisi dei dati prevedeva: il conteggio delle richieste pervenute (una settimana nel 2007 e tre nel 2008); la valutazione delle richieste riportanti il quesito clinico; la congruenza degli esami richiesti in relazione al quesito clinico riportato (effettuata da un gruppo di lavoro sulla base di linee guida e/o raccomandazioni scientifiche). Sono state analizzate 3637 richieste (nel 2007) e 4672 (nel 2008) delle quali riportavano il quesito clinico il 26,5% (2007) e il 21,6%, 21,6% e 26,0% (2008). Le percentuali di richieste con esami classificati come: congruenti è pari a 80,4%, 74,1%, 67,4%, 69,7%; parzialmente congruenti pari a 8,2%, 14%, 18,2%, 17,3%; incongruenti pari a 3,1%, 2,6%, 4,6% 3,9%. Inoltre si è rilevata una percentuale di richieste con quesito clinico non completo pari a 3,1%, 3,6%, 3,7%, 5,8%; non valutabili pari a 5,2%, 4,8%, 6,1%, 3,3%. I risultati dimostrano che l'utilizzo di questi indicatori aiuta il laboratorio ad individuare la tipologia di esami per i quali è necessario approfondire le motivazioni della richiesta ed attivare una strategia comune per migliorare il percorso diagnostico-terapeutico relativamente alla tempistica, ai disagi per il paziente e agli aspetti economici. L'educazione continua, l'implementazione di linee guida per la corretta formulazione del quesito clinico, la formulazione di algoritmi diagnostici che prevedano test riflessi sono strumenti sicuramente necessari per il miglioramento.

Bibliografia

Plebani M. Clin Chim Acta 2003;333:131-9.

069

**DETERMINAZIONE DELL'EMOGLOBINA GLICATA IN PRESENZA DI EMOGLOBINOPATIE**M. Bombara<sup>1</sup>, A. Matteucci<sup>1</sup>, S. Vairo<sup>1</sup>, I. Chiapponi<sup>1</sup>, S. Bernini<sup>1</sup>, T. Cioni<sup>1</sup>, A. La Gioia<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O. Patologia Clinica, Spedali Riuniti, Livorno, A.S.L. 6

Scopo. La cromatografia a scambio cationico ad alta prestazione (HPLC) è fra le metodiche più utilizzate per la determinazione dell'emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>), parametro essenziale per la valutazione del controllo glicemico nei soggetti diabetici. Alcune varianti emoglobiniche, tuttavia, possono interferire con la separazione cromatografica dell'HbA<sub>1c</sub> causando inaccuratezza nella misura della stessa. In questo lavoro vengono esaminati alcuni casi giunti alla nostra osservazione nella normale routine.

Materiali e Metodi. La determinazione dell'HbA<sub>1c</sub> viene effettuata con metodica HPLC (Tosoh HLC-723G7 HbA<sub>1c</sub>Variant Mode). Questo sistema utilizza una corsa cromatografica più lunga di quella necessaria a determinare la sola HbA<sub>1c</sub> in modo da separare le eventuali emoglobine varianti ed escluderle dal calcolo dell'area totale. Le varianti emoglobiniche sono state identificate con Tosoh HLC-723G7BetaThal Mode.

Risultati. In due dei casi osservati sono state evidenziate una HbS (35,7%), insieme con la sua componente glicata, completamente separate dall'HbA ed una HbC (25,6%) con comportamento analogo.

In un caso con forte aumento dell'HbF (21,6%), questa si sovrappone alla forma labile dell'HbA<sub>1c</sub> senza interferire con la separazione dell'HbA<sub>1c</sub> stabile.

Diverso è il caso osservato di eterozigosi S-C in cui l'HbA<sub>1c</sub> non è determinabile per la presenza solo in tracce dell'HbA. In tale situazione sono necessarie metodiche alternative per il controllo glicemico (p. e. fruttosamina).

Conclusioni. La presenza di alcune delle varianti emoglobiniche più frequenti come HbS e HbC allo stato eterozigote o il consistente aumento di HbF non interferisce in maniera sostanziale con la determinazione dell'HbA<sub>1c</sub>, anche se la sua misura sarà comunque meno accurata. La segnalazione da parte del laboratorio di presenza di variante emoglobinica comporta quindi la scelta di utilizzare il dato dell'HbA<sub>1c</sub> non in relazione ai normali livelli di riferimento, ma all'interno della storia clinica del singolo paziente. Inoltre viene raccomandata la successiva determinazione dell'assetto emoglobinico completo (ricerca di emoglobine patologiche), se l'emoglobinopatia non era precedentemente conosciuta.

**Bibliografia**

Terreni A et al. Clin Biochem 2003;36:607-610

070

**VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO DI MIELOPEROSSIDASI PLASMATICA IN PAZIENTI DIABETICI TIPO 2**A. Vernocchi<sup>2</sup>, B. Cremonesi<sup>2</sup>, A. Balini<sup>1</sup>, D. Berzi<sup>1</sup>, G. Meregalli<sup>1</sup>, M. Biffi<sup>2</sup>, S. Calatroni<sup>2</sup>, A. Costardi<sup>2</sup>, E. Tragni<sup>3</sup>, A. Catapano<sup>3</sup>, B. Filippini<sup>1</sup>, A. Bossi<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O. Malattie Metaboliche e Diabetologia, Osp. Treviglio (BG)<sup>2</sup>U.O. Medicina di Laboratorio, Osp. Treviglio (BG)<sup>3</sup>Dip. Scienze Farmacologiche, Università di Milano

Introduzione. La mieloperossidasi (MPO) viene secreta durante l'attivazione di neutrofili, monociti e macrofagi tissutali dopo stimolo flogistico; è considerabile un legame tra stato di infiammazione persistente, stress ossidativo e progressione dell'aterosclerosi (1). Un suo utilizzo è di notevole interesse clinico nella malattia diabetica in cui le complicanze macroangiopatiche costituiscono la più frequente causa di morbilità/mortalità.

Scopo. Valutare l'utilità del dosaggio di MPO plasmatica in pazienti diabetici tipo 2.

Materiali e Metodi. Sono stati studiati 76 soggetti (media ±DS): 19 NGT (13M, 6F) età (anni) 53±9; 30 pazienti DMT2 senza complicanze (22M, 8F), età 59±5; durata malattia (anni) 9±6; 27 pazienti DMT2 con complicanze macrovascolari, (24M, 3F), età 62±5; durata malattia 10±6 anni. Sono stati valutati parametri antropometrici e dati clinici (PAO; ECG basale; IMT; ABI; calcolo del rischio cardiovascolare sec.ISS); sono stati dosati i seguenti analiti: HbA<sub>1c</sub> (HPLC-723-Tosoh Corporation) glicemia, profilo lipidico e hs-PCR (Modular-Roche diagnostics), ApoA1 e ApoB (APS-Beckman) e microalbuminuria (Mega-Merck); è stato eseguito l'emocromo con formula (Sysmex XE2-100) e il dosaggio della MPO, calcolato sul numero assoluto di granulociti circolanti, con metodo immunometrico chemiluminescente automatizzato (Architect-Abbott Diagnostics).

Risultati. Per i parametri antropometrici e di laboratorio sono stati ottenuti i seguenti valori (media ±DS): BMI 28.5±6, circonferenza vita 97.5±14 cm, HbA<sub>1c</sub> 7.4±1.5%, glicemia basale 145±51 mg/dL, MPO 95.5±58 pmol/L, Apo A 1.38±0.2 g/L, Apo B 1.0±0.2 g/L e hs-PCR 2.3±3.8 mg/L. Vengono qui forniti i dati di correlazione fra MPO e gli altri parametri laboratoristici (Coeff. di Correlazione Spearman; test di significatività a 2 code). Si segnala significatività statistica tra valore MPO plasmatica e glicemia basale (p=0.032), MPO e Apo B (p=0.021).

Conclusioni. I dati ottenuti consigliano di approfondire la valutazione su una popolazione più estesa; la correlazione positiva con glicemia e Apo B (fattori di rischio per malattia aterosclerotica) lasciano presupporre che MPO possa risultare utile indicatore di evoluzione di complicanza macroangiopatica.

**Bibliografia**

1. Meuwese MC et al. J Am Coll Cardiol, 2007;50:159-65.

071

**CORRELATION BETWEEN Hb A1c AND GLYCEMIA IN NEPHROPATHIC PATIENTS**

M. Mercadanti<sup>1</sup>, R. Merli<sup>1</sup>, A. Caleffi<sup>1</sup>, R. Aloe<sup>2</sup>, M.T. Marino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Emato-chimica Azienda Ospedaliero-Universitaria Parma

<sup>2</sup>S.S. Dip. Biochimica ad elevata automazione Azienda Ospedaliero-Universitaria Parma

**Aim.** A1c value, the best indicator of glycemetic compensation, reflects the average glycemia in the last 6-8 weeks. The relationship between A1c and daily glycemia is still much discussed. One study has already detected the closest correlation between pre-breakfast glycemia and A1c values. Some authors think that A1c underrates the actual glycemetic compensation in patients with severe kidney failure. Our study aims at assessing the correspondence between A1c and morning glycemia in three groups of nephropathic patients, with and without dialysis treatment. **Materials and Methods.** In the first months of 2009, 292 patients were included in the study: 73 patients from the peritoneal dialysis (PD)outpatient clinic, 73 from the hemodialysis (HD) outpatient clinic, 73 from the general nephrology (GN) outpatient clinic, not subject to dialysis, 73 outpatients (C), with no biochemical evidence of nephropathy. Only patients for whom, concomitantly with A1c, also glycemia, azotaemia and creatininemia were prescribed were included in the study. A1c was determined with HPLC (Variant II, Dual Kit, Bio-Rad, Milan).The biochemical indexes were performed using DXC 800 instruments (Beckman Coulter, Milan).Analyses were performed both of correlation and simple linear regression.

**Results.** Group characteristics: PD group (average uraemia 61.70 mg/dl  $\pm$  30.82, average creatinine 1.56 mg/dl  $\pm$  0.67): average glycemia 96.8 mg/dl  $\pm$  25.6, average A1c 5.8 %  $\pm$  0.8;  $r=0.732^{**}$ ;  $R^2=54\%$ ; HD group (uraemia 162.84  $\pm$ 44.93; creatinine 9.21  $\pm$ 2.6): glycemia 148.22  $\pm$ 60.70, A1c 6.83  $\pm$ 0.97;  $r=0.610^{**}$ ;  $R^2=0.37\%$ ; GN group (uraemia 73.11  $\pm$ 31.90; creatinine 1.70  $\pm$ 0.80): glycemia 130.16  $\pm$  59.39, A1c 6.51  $\pm$ 1.28;  $r=0.591^{**}$ ;  $R^2=0.35\%$ ; C group (uraemia 37.2  $\pm$ 10.8; creatinine 0.88  $\pm$ 0.2): glycemia 133.9  $\pm$ 43.4, A1c 7.1  $\pm$  1.5;  $r=0.736^{**}$ ;  $R^2=0.54\%$ .

**Discussion.** Our results show a significant correlation between A1c and morning/pre-dialysis glycemia in all the groups. The variations in A1c values are more dependent on glycemia values in the PD and C groups, whereas in the HD and GN groups this dependence is less marked. More indepth statistical analyses are being performed for a more complete characterization of the groups under examination.

**References**

Pistrosch F. et al Horm Metab Res 2006;38:455-459.

072

**SCREENING OF THE BACTERIAL INFECTIONS IN THE DIABETIC ULCERS OF THE LOWER LIMBS AND FOOT**

G. Di Domenico<sup>1</sup>, G.M. Leonardi<sup>1</sup>, P. De Cristofano<sup>2</sup>, R. Irace<sup>2</sup>, M. Mottola<sup>3</sup>, D. Calabrese<sup>2</sup>, R. Pierro<sup>2</sup>, C. Nocera<sup>1</sup>, M. D'Amora<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, PO "S. Giovanni Bosco", ASL NA Centro

<sup>2</sup>UOC di Patologia Clinica, PO "S. Giovanni Bosco", ASL NA Centro

<sup>3</sup>UOC di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, AORN "Monaldi"

**Introduction.** The bacterial infections of the lower limbs (LL) and foot ulcers in the diabetic patients are associated with high morbidity and they are subsequently to different pathogenic factors such as: deficit of the leukocytes and macrophages killing, increased levels of the serum glycosides IgG. Accurate identification of the bacterial species and of the source of infection and/or the portal of entry are crucial for optimal management of these infections (1).

**Aims.** The purpose of the present study was to investigate the incidence of the bacterial infections in the diabetic ulcers of the LL and foot in a people of patients hospitalized by our Immunohematology Division and treated with platelet gel, during two year of observation period.

**Materials and Methods.** A total of 80 patients (40LL/40Foot), M/F 35:45; range age 45-92, were enrolled. In the past, all the patients have received different types of the systemic antibiotic therapy. At the first medical visit, a microbiological tampon was performed on each patient. The tampons were cultured in the following culture medium: Agar blood CNA, McConkey, Slanetz-Bartley, MSA, Pseudosel, Sabouraud. If the quantity of germs resulted low, the tampons were enriched in the Brain Heart Infusion (24 h at 37°C). The identified bacteria were successfully screened for the antibiogram (BIO-MERIEUX).

**Results.** The incidence reported of the bacterial infections in the diabetic ulcers of LL was: 65% St. Aureus (60% MRSA), 15% St.Capitis, 15% Ps.Aeruginosa, 2% Ps.Fluorescens, 2% Ps. Mendocina, 1% Acinetobacter baumannii. The incidence reported of the bacterial infections in the diabetic ulcers of foot was: 59% Ps.Aeruginosa, 30% St.Aureus, 5% E. Coli, 2% St.Crhomogenes, 2% St.Wameri, 1% Ps.Mendocina, 1% Ps.Fluorescens.

**Conclusions.** The results of our study show that the St. Aureus is the main bacterium liable to infections of the ulcers of the LL, while the Ps. Aeruginosa prevails in the diabetic foot. These data indicates the need to effect microbiological analyses of high sensibility and specificity in order to reduce and to prevent the incidence of these infections, associated to an enhancement of a good hygiene practices in the diabetic patients.

**References**

1. Seifert H. Clin Infect Dis, 15 (48), 2009.

073

**VALUTAZIONE DELLA PRESTAZIONE DEI GLUCOMETRI ATTRAVERSO IL CONFRONTO CON STRUMENTAZIONE AUTOMATIZZATA**C. Lo Cascio<sup>1</sup>, L. Tretti<sup>1</sup>, F. Disarò<sup>1</sup>, M.S. Graziani<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Analisi Chimiche Cliniche ed Ematologiche, Az. Osp. Verona, Verona

Scopo del lavoro. Valutare le prestazioni in termini di accuratezza dei glucometri utilizzati per la misura della glicemia basale in pazienti da sottoporre a curva da carico orale di glucosio, mediante confronto con la determinazione effettuata su strumentazione automatizzata.

Metodi. Misura della glicemia mediante glucometro (ACCU-CHECK Sensor ROCHE) utilizzando una goccia di sangue venoso residua dopo il prelievo per la glicemia basale. Misura della glicemia basale su plasma raccolto con anticoagulante litio eparina e inibitore della glicolisi sodio fluoruro, mediante analizzatore Dimension RxL MAX (Dade Behring). Controlli di qualità dedicati per il glucometro. Risultati. Nell'arco di 3 mesi e con diversi lotti di strisce reattive e controlli, sono stati analizzati 137 campioni, con valori di glicemia nel range 3.6-8.4 mmol/L. La correlazione tra glucometro e glicemia misurata in laboratorio è:  $y = 0.83x + 0.97$  con un coefficiente di correlazione di 0.85.

La differenza media tra glucometro e autoanalizzatore risulta essere di 0.04 mmol/L (1.2%), Il 90% dei dati dello stick presenta una differenza tra -7.8% a +12.5% rispetto alla determinazione strumentale. L'11% dei campioni ha una differenza assoluta maggiore del 10% rispetto al dato di laboratorio; un solo dato presenta differenza maggiore al 20%. I campioni con le differenze maggiori non presentano caratteristiche particolari né sono stati effettuati in periodi particolari.

Conclusioni. Il confronto con il dato di laboratorio mostra come in questo ambito ci sia un buon accordo tra le due determinazioni. Questo permette di utilizzare la glicemia basale misurata in laboratorio come controllo delle prestazioni del glucometro, posto che i controlli suoi propri, variando il valore atteso in base al lotto di striscia reattiva utilizzata, non rispettano pienamente i requisiti di un controllo interno.

**Bibliografia**

Approved IFCC recommendation on reporting results for blood glucose; Paul D'Orazio, Clin Chem Lab Med 2006;44(12):1486-1490

074

**STRESS OSSIDATIVO NELL'OBESITA': RUOLO DEL DIABETE**F. Bamonti<sup>1</sup>, C. Novembrino<sup>1</sup>, R. De Giuseppe<sup>1</sup>, F. de Liso<sup>1</sup>, A.S. Tirelli<sup>2</sup>, L. Vigna<sup>3</sup>, L. Riboldi<sup>3</sup><sup>1</sup>Dip. Scienze Mediche, Università degli studi di Milano, O.M.P.Ma.RE, Fondazione IRCCS<sup>2</sup>Dip. Area Servizi Diagnostici, Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, O.M.P.Ma.RE, Fondazione IRCCS<sup>3</sup>Dip. Medicina Preventiva Clinica e del Lavoro, U.O. Medicina del Lavoro I, O.M.P.Ma.RE, Fondazione IRCCS

L'obesità è associata a stress cellulare e infiammazione che attraverso disfunzioni endoteliali sono coinvolti nella patogenesi del diabete.

Scopo. Valutare il coinvolgimento dello stress ossidativo in soggetti con diabete associato ad obesità misurando i livelli di LDL ossidato (oxLDL), un nuovo indice di rischio biochimico insieme a quadro lipidico e stato ossidativo.

Metodi. 45 soggetti obesi (17 maschi e 38 femmine; età media  $46.9 \pm 8.7$  anni e BMI  $35.21 \pm 5.41$  Kg/mq) sono stati esaminati per i parametri di routine lipidica, oxLDL (ELISA, Mercodia, Svezia;  $< 70$  U/L), ROS (Reactive Oxygen Species, 250-300 UCarr) e capacità antiossidante totale (TAC,  $> 350$   $\mu\text{molHClO/ml}$ , Diacron International, Italia). In base ai valori di glicemia, i soggetti sono stati divisi in 4 gruppi omogenei per sesso, età e BMI: A (n=23, glicemia normale) B (n=14 alterata glicemia a digiuno), C (n=9 intolleranza glucidica) e D (n=9 diabete).

Risultati. Gr A: oxLDL =  $99.19 \pm 23.75$ ; ROS =  $415.8 \pm 78.8$ ; TAC =  $422.0 \pm 60.5$ . Gr B: oxLDL =  $102.32 \pm 20.09$ ; ROS =  $410.4 \pm 117.0$ ; TAC =  $435.3 \pm 38.0$ . Gr C: oxLDL =  $102.5 \pm 26.05$ ; ROS =  $396.4 \pm 83.7$ ; TAC =  $426.4 \pm 51.1$ . Gr D: oxLDL =  $98.28 \pm 15.9$ ; ROS =  $409.2 \pm 147.7$ ; TAC =  $428.4 \pm 92.7$ . È interessante notare che oxLDL e ROS sono più alti rispetto ai valori normali di riferimento nella maggior parte dei soggetti (91% e 83% rispettivamente), mentre TAC è diminuito solo nel 10% dei casi. Inoltre oxLDL correla significativamente ( $r = 0.6$ ) solo con i livelli dei parametri del quadro lipidico (LDL e colesterolo totale). Nessuna differenza significativa è stata invece trovata fra gruppi per ogni parametro considerato.

Conclusione. I nostri soggetti obesi mostrano una condizione di stress ossidativo dovuto a concentrazione elevata di ROS. A fronte di un generale adeguamento di TAC, l'elevata concentrazione di oxLDL nella maggior parte dei soggetti indica una perossidazione lipidica più avanzata nei casi più severi di dislipidemia. Inoltre, i nostri risultati mostrano che l'obesità di 'per se' è il più importante fattore nell'alterazione dello stato ossidativo piuttosto che il diabete.

**Bibliografia**

1. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sci 2009;84:705-12.

075

**HYPO AND HYPER-GLYCEMIA: INFLAMMATORY STIMULI FOR CIRCULATING MONOCYTES**

D. Bozzato<sup>1</sup>, E. Greco<sup>1</sup>, A. Padoan<sup>1</sup>, S. Moz<sup>1</sup>, A. Sechi<sup>2</sup>, P. Fogar<sup>2</sup>, F. Piarulli<sup>2</sup>, C. Zambon<sup>2</sup>, F. Navaglia<sup>3</sup>, D. Basso<sup>3</sup>, A. Lapolla<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Diagnostic Medical Sciences and Special Therapies

<sup>2</sup>Dept. of Medical and Surgical Sciences

<sup>3</sup>Dept. of Laboratory Medicine

<sup>4</sup>Dept. of Diagnostic Medical Sciences and Special Therapies and Dept. of Laboratory Medicine

**Background.** The activation of pro-inflammatory pathways by metabolic stimuli is involved in the development of atherosclerosis, a major complication of diabetes mellitus. The recruitment of monocytes/macrophages to the vascular wall followed by the release of a series of inflammatory mediators seems to play a major role in atherogenesis.

**Aims.** 1. evaluate the pro-(IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) and anti-inflammatory cytokine (IL10) secretion pattern of monocytes/macrophages isolated from diabetic (D) and non diabetic patients (C) in response to glucose and cholesterol stimuli; 2. ascertain the levels of monocyte chemoattractant protein (MCP1) in the sera of these two groups.

**Methods.** We studied 20D and 20C subjects. Circulating monocytes were purified by negative selection and cultured for 24h in RPMI FCS 10% under conditions of hypo-(2.5 mmol/L) eu-(5 mmol/L) and hyper-glycemia (20 mmol/L) and in the presence of two different cholesterol concentrations (150 and 300 mmol/L). After 20h cells were added with, or left without, LPS stimulus (1 $\mu$ g/ml). IL1 $\beta$ , IL10 and TNF $\alpha$  levels were measured (ELISA) in supernatants. MCP1 levels were assessed (ELISA) in sera. **Results:** in the absence of LPS stimulus, IL1 $\beta$  production by D monocytes was significantly increased under conditions of hypo- with respect to eu-glycemia ( $t=2.57, p<0.05$ ) independently of cholesterol concentration. Under LPS stimulus and in hyperglycemic conditions TNF $\alpha$  production was induced both in C ( $t=-3.5, p<0.05$ ) and D ( $t=-3.02, p<0.05$ ) monocytes while IL10 levels decreased ( $t=3.1, p<0.05$  for C and  $t=2.6, p<0.05$  for D monocytes), independently of cholesterol. MCP1 serum levels were slightly higher in diabetic ( $622\pm 67$  pg/mL) than in non diabetic patients ( $571\pm 56$  pg/mL) ( $p=ns$ ). **Conclusions:** the inflammatory response of circulating monocytes is modified by glucose but not by cholesterol levels. Bacterial stimuli (LPS) in hyper-glycemic conditions seem to favor a pro-inflammatory phenotype characterized by the induction of TNF $\alpha$  and the inhibition of IL10. By contrast hypo-glycemia "per se" activates a pro-inflammatory response: might be this evidence the basis of the cardiovascular outcome in diabetic patients? (ACCORD Study).

**References**

Linton MF et al. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes* 2003;27:S35-40.

076

**LEPTIN CONCENTRATIONS IN METABOLIC SYNDROME PATIENTS WITH AND WITHOUT TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

M. Montagnana<sup>1</sup>, E. Danese<sup>1</sup>, C. Fava<sup>2</sup>, G.

Targher<sup>3</sup>, M. Franchini<sup>1</sup>, S. Bonafini<sup>2</sup>, A. De Cata<sup>3</sup>, O. Ruzzenente<sup>1</sup>, G.L. Salvagno<sup>1</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>, G. Lippi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Verona

<sup>2</sup>Sez. di Medicina Interna C, Dip. di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Verona

<sup>3</sup>Sez. di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Dip. di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Verona

**Aim.** Leptin is an important molecule in regulation of body weight. It has been suggested that high leptin concentrations may reflect resistance to the biological effects of this hormone. Moreover, it has been reported that leptin is related to the metabolic disturbances of Metabolic Syndrome (MetS) and to Diabetes Mellitus (DM). Aim of our study was to investigate potential determinants of leptin concentrations in patients at high cardiovascular (CV) risk, and to assess its relationship with DM.

**Methods.** 60 consecutive male patients affected by at least two CV risk factors which belongs to the NCEP/ATP III definition of MetS were recruited: 30 type 2 DM patients under chronic treatment and 30 non-diabetic patients. Nineteen healthy subjects free from MetS were included as a control group. Serum leptin concentrations were determined by a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (DRG Instrument GmbH, Germany). Variables with a skewed distribution were log-transformed. Results of measurements were compared by T-test. Pearson coefficient was used to study correlation between continuous variables and stepwise linear regression model was set to evaluate the independent determinant of leptin concentration.

**Results.** Leptin was significantly higher in MetS patients respect to controls (7.6 vs. 5.9 ng/mL,  $p=0.021$ ) and in patients without diabetes respect to patients affected by type 2 DM (8.4 vs. 6.7 ng/mL,  $p=0.047$ ). A positive correlation was observed in MetS patients between leptin and triglycerides ( $r=0.332, p=0.009$ ), waist ( $r=0.356, p=0.005$ ) and number of MetS criteria ( $r=0.352, p=0.006$ ). No correlation was found with the other characteristics of the MetS and C-reactive protein. In multivariate model only waist remained significantly associated with leptin level (beta coefficient $\pm$ SEM:  $0.116\pm 0.43, p=0.040$ ).

**Conclusions.** In moderate to high risk patients carrying at least 2 features of MetS, leptin level is independently associated only with waist. Leptin levels was unexpectedly lower in DM patients respect to non diabetics. Therefore, DM per se seems not to be a major determinant of leptin, though we cannot rule out a leptin modulating effect of oral antidiabetic drugs.

**References**

Leyva F, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:928-33.

077

**OXIDATIVE STATUS IN DIABETES PATHOGENESIS:  
THE ROLE OF INNOVATIVE ANALYTES**C. Novembrino<sup>1</sup>, L. Vigna<sup>2</sup>, R. De Giuseppe<sup>3</sup>, F. de Liso<sup>3</sup>, A.S. Tirelli<sup>4</sup>, L. Riboldi<sup>2</sup>, F. Bamonti<sup>3</sup><sup>1</sup>Dip. di Scienze Neurologiche, Univ. degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E., Milano<sup>2</sup>U.O. Medicina del Lavoro 1 Clinica del Lavoro L. Devoto, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E., Milano<sup>3</sup>Dip. di Scienze Mediche, Univ. degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E., Milano<sup>4</sup>Lab. Patologia Clinica, Dip. Area Servizi Diagnostici, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E., Milano

Evidence has shown that subjects with type 2 diabetes have increased levels of lipid peroxidation, DNA and protein damaged by oxidation, presumably due to an overproduction of free radicals and/or a decreased antioxidative defence, caused by hyperglycaemia, insulin resistance and hyperinsulinaemia.

**Aim.** Oxidized LDL (marker of lipid peroxidation) together with oxidative status and lipid panel parameters were measured to evaluate the correlation between hyperglycaemia and oxidative cellular stress.

**Subjects and Methods.** We evaluated routine lipid parameters and blood glucose concentration, oxLDL by competitive ELISA method (Merckodia, Sweden; <70U/L), Reactive Oxygen Species concentrations (ROS, 250-300 UCarr) and Total Antioxidant Capacity (TAC, >350 µmol-HClO/mL) by spectrophotometric method (Diacron International, Italy) in 40 subjects (20 males, 20 females; mean age 63.3±9.8 years). According to glycemic status, subjects were divided into three groups matched for sex and age: A (n=19, normal fasting blood glucose), B (n=10, impaired fasting blood glucose) and C (n=11, diabetes). Statistical analysis was performed by R system.

**Results.** Subjects generally showed normal TAC values. Interestingly, ROS concentrations were higher in group C (354.7±60.8UCarr) than in B (328.5±67.6UCarr) and significantly higher (p<0.05) in group C than in A (318.3±38.9UCarr). Moreover, ROS value was altered in 66% of group A cases, 60% of group B and 91% of group C. OxLDL concentrations correlated with glycemic status (p=0.0016, r=0.48), in fact oxLDL levels were significantly higher (p<0.05) in group C (90.8±15.1) than in group A (74.8±9.5) and in group B (76.4±10.9).

OxLDL values correlated significantly with the levels of lipid panel parameters (HDL-Chol: r=-0.35, p=0.02; triglycerides: r=0.33, p=0.03).

**Conclusion.** Diabetes is characterized by oxidative stress (due to elevated ROS concentrations, despite adequate TAC) resulting in lipid peroxidation whose levels correlate with the degree of dyslipidemia; such condition is not yet fully evident in case of impaired fasting blood glucose. Our results suggest the importance of monitoring subjects at risk in order to prevent oxidative cellular damage, exacerbating the pathogenesis of diabetes, and provide adequate treatment.

078

**RUOLO DELLA DETERMINAZIONE  
CITOFUORIMETRICA DELLE CATENE  
LEGGERE KAPPA E LAMBDA DI SUPERFICIE  
NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE  
LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE**M. Ghimenti<sup>1</sup>, S. Di Beo<sup>1</sup>, M. Parenti<sup>1</sup>, M.R. Metelli<sup>1</sup>, G. Carulli<sup>2</sup>, P. Pietrini<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O. Analisi Chim. Clin. Specializzate Univ., Azienda Osp. Univ. Pisana, Dip. di Medicina di Laboratorio e Diagnostica Molecolare<sup>2</sup>U.O. Ematologia Universitaria, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

**Scopo dello studio.** Le patologie linfoproliferative croniche hanno origine da cellule bloccate nei vari stadi di differenziazione linfocitaria B e T e in particolare sono solitamente caratterizzate da espansioni clonali di una singola cellula che esprime uniformemente lo stesso isotipo di catena leggera. Lo studio prevede la valutazione citofluorimetrica delle catene leggere kappa e lambda di superficie nella diagnosi di leucemia linfatica cronica a B-cellule (B-LLC), linfoma a cellule mantellari (MCL) e leucemia a cellule capellute (HCL) basata sulla loro espressione in base a due livelli di fluorescenza: medio-alta o bassa intensità.

**Pazienti e Metodi.** La tipizzazione linfocitaria su sangue periferico e midollare di 128 pazienti con B-LLC, 7 con HCL e 60 con MCL è stata eseguita mediante un pannello anticorpale specifico. Per la determinazione delle catene leggere kappa e lambda sono state utilizzate rispettivamente due miscele di anticorpi monoclonali anti-CD19/anti-kappa/CD45 e anti-CD19/anti-lambda/CD45 mediante citofluorimetro FACSCalibur.

**Risultati.** I 195 pazienti analizzati sono stati suddivisi in tre gruppi corrispondenti alle patologie considerate e ciascun gruppo a sua volta ridistribuito in due sottogruppi relativi ai due livelli di intensità di fluorescenza. L'espressione delle catene leggere kappa e lambda è risultata a bassa intensità di fluorescenza nel 92% dei pazienti con B-LLC, a medio-alta intensità nell'80% dei pazienti con MCL e nell'86% con HCL.

**Conclusioni.** Nello studio abbiamo osservato come l'espressione a bassa intensità di fluorescenza contraddistingua soltanto la B-LLC, rappresentando pertanto un valido aiuto nella diagnosi differenziale tra B-LLC e MCL e tra B-LLC e HCL. Diversamente, non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra MCL e HCL per intensità di fluorescenza, forse dovuto al numero esiguo di pazienti in studio. In conclusione, l'espressione delle catene leggere di superficie può essere considerato un parametro biologico estremamente utile nella diagnosi differenziale delle patologie linfoproliferative croniche.

**Bibliografia**

Braylan RC. Cytometry A. 2004 Mar;58(1):57-61.

079

**VALUTAZIONE IN CIECO DEI FILE DI CAMPIONI ONCOEMATOLOGICI ESEGUITI SU ADVIA 2120 E CORRISPONDENZA FRA ORIENTAMENTO DIAGNOSTICO E DIAGNOSI DEFINITIVA**

V. Rocco<sup>1</sup>, T. Catalano<sup>2</sup>, G. Devoto<sup>3</sup>, D. Tanca<sup>3</sup>

<sup>1</sup>A.O. "Rummo" Lab. Patologia Clinica, Benevento

<sup>2</sup>A.I.L. onlus sezione "Stefania Mottola" di Benevento

<sup>3</sup>S.C. Laboratorio Analisi P.O. di Lavagna Settore Ematologia, Citometria e Coagulazione

Introduzione. La cosiddetta "morfologia strumentale" degli analizzatori ematologici quale metodo di screening diagnostico per le patologie ematologiche ha avuto un ampio risalto negli anni '80-'90. Per valutare se la "morfologia strumentale" mantiene la sua validità clinica nello screening diagnostico precoce anche nel secolo del consolidamento e nascita dei "megalaboratori" ed anche per un percepito disinteresse per questa disciplina nell'era della citofluorimetria e citogenetica, 2 U.O. di Patologia Clinica di medie dimensioni si sono scambiati i file di campioni di pazienti con patologie oncoematologiche.

Materiali e Metodi. I file di 1780 campioni di patologie oncoematologiche raccolti negli ultimi anni in uno dei 2 laboratori ed eseguiti su ADVIA 2120 Siemens sono stati esaminati in cieco da un operatore del secondo laboratorio con esperienza ventennale su questo tipo di tecnologia. I file sono stati ritornati al laboratorio di origine per il controllo del proposto orientamento diagnostico formulato nel modo seguente: CLL; MLC atipica; AML; ALL; Mononucleosi; CML; Malattia Mieloproliferativa; MDS; CML-a; CMML; ITP; Crioglobulinemia.

Risultati. La valutazione della "morfologia strumentale" dei 1780 campioni (relativi a 312 diversi pazienti) da parte del primo patologo e il controllo della corrispondenza fra orientamento diagnostico e diagnosi definitiva da parte del secondo patologo ha messo in evidenza 1 sola discordanza rispetto alla linea linfoide o mieloidale delle leucosi sia acute che croniche, solo 3 in rapporto alla differenziazione fra CLL e MLC atipiche, mentre diverse MDS classificate come AREB dal primo patologo erano classificate come AML.

Discussione - Conclusioni. La valutazione della "morfologia strumentale" su ADVIA 2120, oltre a permettere un orientamento diagnostico precoce con innegabile ricaduta sui pazienti, consente ai 2 laboratori un notevole risparmio in termini di marcatori da utilizzare per il successivo step diagnostico citofluorimetrico. Superando le difficoltà legate a gare di service e alle "centralizzazioni degli acquisti", bisognerebbe trasmettere ai patologi più giovani questa cultura così come fu insegnata la morfologia classica, anche con la rinascita del progetto "rete neurale".

080

**DIFFERENTE COMPORTAMENTO DELLA ERITROPOIESI NELLA RISPOSTA A TERAPIA CON 5 AZACITIDINA E LENALIDOMIDE IN UNA PAZIENTE CON SINDROME MIELODISPLASTICA (MDS) 5Q-**

M.G. Pirofalo<sup>1</sup>, D. Avino<sup>1</sup>, A. Di Palma<sup>1</sup>, I. Soriente<sup>1</sup>, B. Talento<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

Introduzione. La terapia farmacologica può eliminare la trasfusione dipendenza in pazienti con Sindrome Mielodisplastica. La MDS 5q- è caratterizzata da risposta alla terapia con lenalidomide, con possibilità di risposta citogenetica di eliminazione del clone 5q-

L'uso di citogrammi ed indici eritrocitari e reticolocitari consente di valutare se l'eritropoiesi che supporta la trasfusione indipendenza da 5 azacitidina o da lenalidomide sia normale o conservi aspetti displastici.

Materiali e Metodi. Una paziente affetta da MDS 5q- ha risposto a terapia con 5 azacitidina (75mg/mq x 6gg. ogni 28 gg. per 6 mesi) e, dopo perdita di risposta, a terapia con lenalidomide (10mg/die ridotti a 5mg per tossicità ematologica per 6 mesi), raggiungendo in entrambi i casi trasfusione indipendenza. L'eritropoiesi è stata valutata con citogramma volume/concentrazione di emoglobina eritrocitaria, volume cellulare medio eritrocitario (MCV) e reticolocitario (MCVr), ottenuti con analizzatore SIEMENS ADVIA 2120.

Risultati. La trasfusione indipendenza è stata raggiunta in maniera differente dai 2 farmaci: la risposta a terapia con 5 azacitidina è stata supportata da persistenza di un citogramma "displastico", con anisocitosi ed anisocromia ed elevati MCV e MCVr, con quest'ultimo immutato durante la terapia; la risposta a terapia con lenalidomide è stata caratterizzata invece da una progressiva perdita di aspetti displastici a favore di aspetti "normali": spostamento del citogramma verso la zona centrale, riduzione di anisocitosi ed anisocromia, diminuzione di MCV e MCVr.

Conclusioni. Il caso descritto mostra come l'effetto farmacologico che produce trasfusione indipendenza possa essere raggiunto con modalità diverse che fanno ipotizzare differenti meccanismi di azione agenti sulla eritropoiesi. 5 azacitidina e lenalidomide determinano quadri emocitometrici differenti (displastico il primo, tendenzialmente normale il secondo). I citogrammi ed i parametri utilizzati consentono di valutare in maniera semplice e riproducibile le caratteristiche della eritropoiesi, contribuendo alla comprensione di aspetti non ancora chiariti.

Bibliografia

Cazzola M. Myelodysplastic disorders-coping with ineffective Hematopoiesis N Engl J Med 2005;352:536-538.

081

### RILEVAMENTO DEI VALORI DI Hb A<sub>2</sub> MEDIANTE STRUMENTAZIONE AUTOMATICA HPLC ED ELETTROFORESI EMOGLOBINICA SU ACETATO DI CELLULOSA: ANALISI DELLA CORRELAZIONE

A. Amato<sup>1</sup>, D. Ponzini<sup>1</sup>, P. Di Biagio<sup>1</sup>, F. Lama<sup>2</sup>, A. Lamioni<sup>1</sup>, E. Melis<sup>1</sup>, M. Lerone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A.N.M.I. Onlus, Centro Studi Microcitemie, Roma

<sup>2</sup>Centro Biostatistica e Bioinformatica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Tor Vergata", Roma

Presso il Centro Studi della Microcitemia di Roma vengono applicati correntemente per la determinazione dei valori di Hb A<sub>2</sub> sia un protocollo standardizzato per l'elettroforesi emoglobinica su acetato di cellulosa (Alfa Wassermann Inc., West Caldwell, NJ, USA) che metodi HPLC applicati su strumentazione Variant II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e HA8160 (Menarini Diagnostici, Firenze, Italia).

Il presente studio intende verificare la correlazione tra i risultati ottenuti applicando dette procedure sullo stesso campione.

Abbiamo sottoposto ad elettroforesi emoglobinica su acetato di cellulosa e analisi HPLC mediante Variant II e HA8160 n. 837 sul totale di 14.286 esaminati presso il nostro Centro nel corso del 2008. Il valore di lettura densitometrica e cromatografica dell'Hb A<sub>2</sub> è espresso in %. Lo studio è stato condotto in doppio cieco. L'analisi statistica è stata effettuata con R 2.8.1.

Abbiamo effettuato l'analisi statistica secondo 3 modalità:

1. analisi della correlazione tra Variant II e HA8160 ottenendo un coefficiente di correlazione pari a 0.97;
2. analisi della correlazione tra HA8160 ed elettroforesi emoglobinica su acetato di cellulosa ottenendo un coefficiente di correlazione pari a 0.94;
3. analisi della correlazione tra Variant II ed elettroforesi emoglobinica su acetato di cellulosa ottenendo un coefficiente di correlazione pari a 0.96.

I dati ottenuti mettono in evidenza un buon allineamento tra strumenti automatici HPLC che utilizzano sistemi analitici analoghi, ma anche tra i valori di Hb A<sub>2</sub> rilevati in HPLC e quelli ottenuti con elettroforesi emoglobinica.

Lo studio evidenzia una eccellente correlazione tra i dati di Hb A<sub>2</sub> ottenuti con i tre sistemi applicati ed in particolare rivaluta l'utilizzazione dell'elettroforesi emoglobinica su acetato di cellulosa, quando eseguita con protocolli rigorosi e standardizzati.

082

### SYMEX XE 2100: INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLE PIASTRINE IMMATURE (IPF) DI IN ETÀ PEDIATRICA

S. Buoro<sup>1</sup>, R. Gustinetti<sup>1</sup>, P. Dominoni<sup>1</sup>, A. Crippa<sup>1</sup>, C. Ottomano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.Z. Ospedali Riuniti, Bergamo

Scopo. L'accurato conteggio delle piastrine (PLT) e dei parametri correlati, quale l'IPF%, concorrono all'inquadramento e al monitoraggio delle piastrinopatie.

Per contestualizzare i risultati è indispensabile disporre dei relativi intervalli di riferimento (I.R.), ma la letteratura riporta dati incompleti per età pediatrica.

Questo studio si propone di verificare l'I.R. di IPF e altri parametri morfologici piastrinici forniti da XE-2100 per tale età.

Materiali e Metodi. L'analizzatore SYMEX XE2100 (Symex, Kobe, Japan) con Software IPF-Master per la rilevazione di IPF%, è stato utilizzato secondo le specifiche del Fornitore. 149 soggetti non consecutivi, di età compresa fra 0 e 168 mesi suddivisi in 6 fasce d'età e 34 soggetti adulti, con età compresa fra i 21 e gli 80 anni, sono stati reclutati col criterio di selezione a priori per: assenza di malattie conclamate, valori di emocromo e formula, Creatinina, AST, AST, LDH, Glucosio, Proteina C Reattiva e Ferritina normali. I dati sono stati elaborati mediante software Analyse-it vers.2.2.

Risultati. Per la popolazione pediatrica, in funzione delle classi di età, il valore mediano delle PLT oscilla da 280 10<sup>3</sup> /mCL a 341 10<sup>3</sup> /mCL, delle IPF% da 0.8% a 1.4% mentre il valore mediano complessivo di IPF% è 1,20%. Nella popolazione adulta il valore mediano delle PLT è 220 10<sup>3</sup> /mCL e di IPF è 2,20%.

Discussione e Conclusione. I risultati evidenziano una sostanziale concordanza con la Letteratura dei valori dei principali parametri dell'emocromo nella popolazione pediatrica; il valore mediano di IPF pari al 1,2% è, invece, significativamente più basso (p<0.001) rispetto agli adulti sia come da Letteratura che per i 34 soggetti della nostra casistica.

In particolare il valore IPF (1,90%) al 25° percentile negli adulti studiati è superiore al valore IPF (1,73%) al 75° percentile dei bambini, così come la mediana degli adulti è molto più elevata rispetto ai bambini (2,20% rispetto a 1,20%).

Concludendo l'I.R. e il valore mediano IPF% del bambino sono diversi dall'adulto; è comunque necessario confermare il dato in un gruppo più ampio e che copra tutto il territorio italiano.

Bibliografia

Thomas S. Kickler et al. Am J Clin Pathol 2006;125:282-7.

083

**UNA NUOVA FUNZIONE DISCRIMINANTE MDCHR PER LO SCREENING DEL TRAIT BETA TALASSEMICO(BTT)**

P. Vicinanza<sup>1</sup>, M. Vicinanza<sup>1</sup>, V. Cosimato<sup>1</sup>, A. Massari<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. di Patologia Clinica, Az. Osp. San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona, Salerno

Introduzione. L'anemia microcitica, può essere carenziale o genetica (BTT). Le talassemie sono caratterizzate da deficit di sintesi della catena  $\alpha$  o  $\beta$ . Mumerosi sono le FD proposte per lo sceening del BTT. Oggi si usano il % dell'HbA2 e dell'HbF, lo stato del ferro, l'elettroforesi dell'Hb o l'HPLC, la sintesi delle globine  $\alpha$  e  $\beta(\alpha/\beta)$  e l'analisi molecolare in PCR. Tali metodi sono costosi e non utilizzabili su larga scala.

Scopo. Costruire un algoritmo semplice e applicabile su tutti gli autoanalizzatori ematologici.

Materiali e Metodi. Abbiamo costruito un polinomio, l'MDCHR =  $(NrbcxMCHCx50/MCV)$ . Ottenuto come prodotto fra la densità del cluster eritrocitario e la superficie di quello dell'Hb. Esso combina sia la maggiore omogeneità dell'MCV e dell'Hb che l'aumento della densità del cluster dell'rbc.

Casistica. 2430 soggetti, 1027 microcitici, fra 8 e 80 anni, 311 BTT e 716 non BTT. I campioni sono stati esaminati entro sia su H3 che su XE-2100. L'HbA2 è stata valutata su VHTS. I parametri dell'MDCHR e dell'HbA2 sono stati elaborati con l'analisi discriminante e la curva ROC.

Risultati. I crt, hanno mostrato MDCHR molto differenti. I microcitici BTT hanno MDCHR superiori sia ai riferimenti che agli IDA. La curva ROC ha evidenziato assenza di falsi positivi (FP) mentre i veri positivi (VP) sono 0,94. L'MDCHR si mostra superiore a quelli della letteratura perchè più specifico, più sensibile ed utilizzabile su tutti gli autoanalizzatori.

References

1. Vicinanza P, Catalano L, Franco F, et al. (2002) Two new HDW-based indexes to identify  $\beta$ -thalassemia trait. *Laboratori Hematology* 8, 193-199.
2. Johnson CS, Tegos C, Beutler E. Thalassemia minor: routin erythrocyte measurement and differentiation from iron deficiency. *Am J Clin Pathol* 1983;80:31-36.
3. Bentley SA, Ayscue LH, Watson JM, et al. The clinical utility of discriminant functions for the differential diagnosis of microcytic anaemias. *Blood Cells* 1989;15:575-582.
4. Shine I, Lal S. A strategy to detect beta thalassemia minor. *Lancet*, 1977;1:692.
5. England JM, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassemia trait by routin blood-count. *Lancet*. 1973;1:449-452.

084

**VALUTAZIONE DEI RESEARCH POPULATION DATA COULTER LH 750 IN PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON OXALIPLATINO E FLUOROURACILE PER ADENOCARCINOMA DEL COLON (ADC) E LORO FOLLOW UP**

E. Orlandini<sup>1</sup>, S. Lonardi<sup>2</sup>, E. Bruzzi<sup>1</sup>, F. Bergamo<sup>2</sup>, I. Fabbri<sup>1</sup>, N. Di Gaetano<sup>3</sup>, G. Gessori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, ASL 14 Piove di Sacco, Padova

<sup>2</sup>Istituto Oncologico Veneto, Padova

<sup>3</sup>Instrumentation Laboratory, Milano

Scopo dello studio. Per lo studio delle popolazioni leucocitarie la strumentazione Coulter LH750 misura per ogni campione valori medi (M) e eterogeneità (DS) di volume (V), conduttività (C) e scatter (S) cellulari, denominati Research Population Data (RPD). La nostra precedente esperienza sul follow up di 12 pazienti in terapia per ADC con oxaliplatino e fluorouracile con schema FOLFOX-4 (André T. et al NenglJM2004) aveva definito promettente l'uso dei RPD monocitari. Scopo del presente studio è valutare i RPD in ulteriori 25 pazienti, associando informazioni relative all'immunofenotipo linfocitario.

Materiali e Metodi. Abbiamo eseguito l'esame emocromocitometrico su LH750 e la tipizzazione linfocitaria di base su Coulter EPICS XL all'inizio del ciclo terapeutico e ogni 2 settimane per i successivi 6 mesi. Per ogni campione è stata valutata microscopicamente la formula leucocitaria. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con MedCalc. Risultati. l'analisi dei RPD Coulter LH 750 conferma la capacità discriminatoria di Mo-SM e Mo-SSD per i pazienti ACD rispetto ai normali. Il cut-off è di 90.2 (AUC=0,82) per SM e di 11,6 (AUC=0,77) per SSD. Nei pazienti ACD i valori medi dei parametri RPD non subiscono variazioni significative nel corso del tempo, pur diversificandosi sempre dai normali (92+/-3 vs 86+/-4). Analizzando invece i dati dei singoli pazienti si evidenziano due momenti di netta diminuzione di Mo-SM: uno a 3 settimane e uno a 8 settimane circa dall'inizio della terapia, concordanti con variazioni morfologiche all'osservazione microscopica. Analizzando il comparto linfocitario, abbiamo osservato a 8 settimane un incremento di Ly-SM, indice di una maggiore attivazione cellulare, e un aumento del numero assoluto dei linfociti T citotossici (CD3+CD8+).

Conclusioni. La valutazione di RPD conferma i dati clinici di ridotta tossicità del protocollo terapeutico sui granulociti. L'analisi del follow-up suggerisce invece un possibile effetto sui monociti che perderebbero in due momenti critici del trattamento parte della funzionalità, compensata probabilmente in tali fasi da una attivazione linfocitaria T citotossica. I dati preliminari ci inducono ad approfondire tale studio con l'immunofenotipizzazione monocitaria.

085

**ANALISI DEL FILE FCS (PEROX/FORWARD SCATTER) PER LA VALUTAZIONE DI UNA NUOVA SOGLIA MONOCITARIA SU ADVIA 2120**

V. Rocco<sup>1</sup>, T. Catalano<sup>2</sup>, M. Fumi<sup>1</sup>, G. Gaudenzi<sup>1</sup>, N. Sarracco<sup>1</sup>, M. Simeone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A.O. "Rummo" La. Patologia Clinica, Benevento

<sup>2</sup>A.I.L. Onlus sezione "Stefania Mottola" di Benevento

**Introduzione.** La conta dei monociti è un parametro essenziale per la diagnosi delle malattie del sangue. Come parte della conta differenziale, è generalmente eseguita mediante gli emocitometri automatici. Tuttavia, i monociti sono in alcune circostanze difficili da identificare, anche con le più sofisticate tecnologie. Pertanto, è stato suggerito l'uso di anticorpi monoclonali come migliore soluzione pratica per la conta monocitaria. I sistemi ematologici basati sulla perossidasi fin dagli anni '90 dimostrarono accuratezza e precisione nel distinguere i Monociti dai linfociti attivati e dai neutrofili immaturi. L'utilizzo di una nuova soglia su ADVIA 120 portò ad una sostanziale sottostima della conta dei monociti, parzialmente corretta dalla nuova soglia mobile su ADVIA 2120.

**Materiali e Metodi.** Sono state valutate le conte monocitarie in 54 casi di monocitosi (25 reattive e 29 CMML) mediante: a) esame dello striscio di sangue periferico eseguito da 2 diversi esperti patologi con una conta a 200 cellule (100 + 100); b) ADVIA 120; c) ADVIA 2120; d) conta monocitaria eseguita mediante valutazione del file FCS (contenuto perossidasi vs FSC) e nuovo tipo di soglia monocitaria (box ovalare dalle LUC alla valle col cluster dei neutrofili). Queste conte sono state confrontate con la valutazione citofluorimetrica dei monociti mediante marcatura quadrupla con CD45/CD14/CD64/CD16 e analisi con CXP analysis 2.2.

**Risultati.** Mentre viene ribadito come da studi precedenti l'elevato CV delle conte su striscio periferico sia intra- (CV medio 15,5% per il 1° patologo e 17,7% per il 2°) che inter-operatore (CV 14,4%), si rileva nelle Monocitosi Reattive (11-17%): una sottostima media del 17,38% su ADVIA 120, del 12,85% su ADVIA 2120, del 1,5% con il nuovo tipo di soglia. Nelle Monocitosi displastiche (11-47%): una sottostima media del 29,45% su ADVIA 120, del 18,19% su ADVIA 2120; del 3,3% con il nuovo tipo di soglia.

**Conclusioni.** Il nuovo tipo di soglia per i monociti, studiata mediante esame del file FCS (perossidasi /FSC), fa rilevare un sostanziale concordanza rispetto al metodo ritenuto la migliore soluzione per la conta dei monociti. La concordanza fra i 2 metodi rimane buona anche in casi di displasia monocitaria.

086

**I PARAMETRI POSIZIONALI DEL COULTER LH750 NELLA DIAGNOSI PRECOCE DI PROCESSI INFETTIVI**

R. Lovero<sup>1</sup>, M. Pepe<sup>1</sup>, A. Carucci<sup>1</sup>, A. Olivi<sup>1</sup>, A. Legrottaglie<sup>1</sup>, A. Scianaro<sup>1</sup>, E. Vinci<sup>1</sup>, S. Stallone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. C. Lab. di Analisi Fasano Ostuni Cisternino (BR)

L'analizzatore ematologico Coulter LH750 (Beckman Coulter) utilizza la tecnologia VCS (Volume, Conduttività, Scatter) per la differenziazione delle cinque popolazioni leucocitarie. La precoce diagnosi di infezione acuta è molto importante per il management del paziente. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare se i parametri VCS correlano con i tradizionali indici di flogosi nei pazienti con diagnosi certa di infezione acuta (emoculture positive e/o segni clinici di sepsi).

**Materiali e Metodi.** È stato analizzato il sangue periferico di 60 pazienti con accertato processo infettivo acuto, e 100 campioni di controllo. I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SD, (confronto delle medie mediante test t di Student) e come coefficiente di Pearson; i valori con  $p < 0.05$  sono stati considerati significativi.

**Risultati.** In questo studio abbiamo analizzato i parametri VCS di pazienti con un processo infettivo acuto in correlazione con parametri di flogosi come proteina C reattiva, VES, Fibrinogeno. È stato osservato un incremento significativo del volume medio dei neutrofili (MNV) ( $140 \pm 9,2$  vs  $151 \pm 7,9$ ;  $p < 0,01$ ) e una significativa diminuzione del light scatter (MNS) ( $143 \pm 7,5$  vs  $137 \pm 5,5$ ;  $p < 0,01$ ) nei pazienti con processi infettivi rispetto ai soggetti di controllo. Non c'era differenza tra i valori medi della conduttività dei neutrofili (MNC) tra patologici e campioni di controllo ( $138 \pm 5,5$  vs  $137 \pm 5,5$ ;  $p > 0,05$ ). Inoltre abbiamo osservato che l'MNV dei pazienti con processo infettivo acuto correlava con indici di flogosi quali PCR ( $r.ln=0,74$   $p < 0,05$ ), VES ( $r.ln=0,54$   $p < 0,05$ ), fibrinogeno ( $r.ln=0,34$   $p < 0,05$ ). Allo stesso modo l'MNS dei pazienti correlava con gli stessi indici di flogosi: PCR ( $r.ln=0,43$   $p < 0,05$ ), VES ( $r.ln=0,73$   $p < 0,05$ ), fibrinogeno ( $r.ln=0,16$   $p < 0,05$ ).

**Conclusioni.** I risultati ottenuti mostrano come la tecnologia VCS permetta di ottenere delle informazioni sulla popolazione granulocitaria di pazienti affetti da un processo infettivo acuto che, in associazione agli indici di flogosi, possono essere di ausilio per una precoce diagnosi.

**Bibliografia**

Chaves F, Bethany Tierno MD, et al. Quantitative Determination of Neutrophil VCS Parameters by CoulterAutomated Analyzer. Am J Clin Pathol 2005;124:440-4.

087

**INCIDENZA DEL DEFICIT DI GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI NELLA POPOLAZIONE AFFERENTE AL LABORATORIO SPECIALISTICO DI EMATOLOGIA DEL P.O. SAN GIOVANNI BOSCO DI NAPOLI**

M. Caldora<sup>1</sup>, A. Amazzini<sup>1</sup>, R. Brino<sup>1</sup>, S. Fontanarosa<sup>1</sup>, M. Giuliano<sup>1</sup>, M. Mucciardi<sup>1</sup>, R. Napolitano<sup>1</sup>, P. De Luca<sup>2</sup>, M. D'Amora<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. Specialistico di Ematologia P.O. S. Giovanni Bosco, ASL NA1

<sup>2</sup>Medicina Nucleare P.S.I. Elena D'Aosta, ASL NA1

<sup>3</sup>U.O.C. di Patologia Clinica P.O. S. Giovanni Bosco, ASL NA1

Introduzione. La carenza dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) causa una malattia genetica X-linked ad alta eterogeneità molecolare, clinica e di laboratorio. Tale deficit ha frequenza media più elevata in America, Oceania, Medio Oriente e Paesi Mediterranei ed in Italia in Sardegna e nel Meridione. Le recenti migrazioni hanno però diffuso questo deficit anche in altre regioni. L'identificazione dei portatori è importante per prevenire le complicanze cliniche associate alla carenza di G6PD (ittero neonatale e crisi emolitiche acute scatenate da fattori esogeni).

Scopo. Stimare l'incidenza del deficit di G6PD nella popolazione afferente al nostro laboratorio e valutare la validità dei test adottati.

Materiali e Metodi. Dal 2002 ad oggi abbiamo analizzato 769 campioni di sangue con un test qualitativo, uno semiquantitativo colorimetrico (Dasit) ed uno quantitativo spettrofotometrico (Dasit). Il primo, sec. Brewer, si basa sull'ossidazione dell'emoglobina a metaemoglobina da parte del nitrito di sodio e nella riconversione enzimatica ad emoglobina in presenza di blu di metilene. Il secondo, modificato da Motulsky e Campbell-Krant, prevede la riduzione da parte del NADPH dell'indicatore blu diclorofenolo indofenolo nella sua forma incolore in presenza di fenazina metasolfato. La velocità con cui il colore scompare dalle miscele di reazione è proporzionale al contenuto di G6PD nei globuli rossi. Il terzo, modificato da Kornberg e Horecker, misura la velocità di formazione del NADPH, proporzionale all'attività della G6PD, come incremento di assorbanza a 340 nm.

Risultati. Dei 769 soggetti esaminati, (541 maschi e 228 femmine) 15 sono risultati carenti dell'enzima (10 maschi e 5 femmine).

Conclusioni. Nella popolazione afferente al nostro laboratorio l'incidenza del deficit di G6PD è pari all'1.9% dei pazienti esaminati. Abbiamo inoltre evidenziato un buon accordo fra i dati prodotti dal metodo semiquantitativo e quello quantitativo spettrofotometrico mentre il test qualitativo risulta non sempre correlato ai primi due nelle femmine eterozigoti per il fenomeno del mosaicismo.

088

**INDICATORE DI SIGNIFICATIVITA' DELLE VARIAZIONI DEL CONTEGGIO PIASTRINICO IN PAZIENTI IN TERAPIA INTENSIVA**

G. Introcaso<sup>1</sup>, M. Raggi<sup>1</sup>, T. D'Errico<sup>1</sup>, S. Paccagnini<sup>1</sup>, R. Temporiti<sup>1</sup>, A. Cavallero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. di Medicina di Laboratorio, Centro Cardiologico "Monzino", IRCCS, Milano

Introduzione. I sistemi impedenziometrici sono tra i metodi di maggiore utilizzo per il conteggio piastrinico. Sono note limitazioni analitiche: assenza di discriminazione rispetto a frammenti cellulari di simile dimensione o a aggregati piastrinici. In condizioni patologiche, il monitoraggio mediante valori consecutivi assume un ruolo fondamentale. Scopo del presente lavoro è fornire per il conteggio piastrinico un indicatore di significatività di risultati seriali.

Materiali e Metodi. I conteggi PLT, effettuati con analizzatore Coulter HmX, sono appartenenti a pazienti ricoverati nell'anno 2008 nel reparto di terapia intensiva cardiovascolare post-operatoria. Sono state selezionate dal database di laboratorio 1101 variazioni ematiche relative a conteggi PLT <150x10<sup>9</sup>/L. Una coppia di conteggi consecutivi è stata comparata tramite il valore di cambio di riferimento (RCV) bidirezionale con significatività al 95%. Il valore RCV (%) è stato espresso come valore critico RCV (PLT x 10<sup>9</sup>/L) elaborando la seguente formula: 1° valore PLT(1 +/- RCV), dove (1+RCV) è fattore incrementale e (1-RCV) fattore decrementale.

I casi di piastrinopenia grave sono stati valutati in associazione a trasfusione con pool piastrinici.

Risultati. Il valore RCV calcolato è risultato pari al 26%. I dati raccolti dalla comparazione del secondo conteggio PLT rispetto all'indicatore RCV sono stati i seguenti: 136 incrementi e 92 decrementi hanno superato l'RCV, 370 incrementi e 503 decrementi non hanno superato l'RCV (p<0.0001). Abbiamo classificato, relativamente alle 228 variazioni significative, 122 pazienti di cui 23 hanno ricevuto terapia trasfusionale con incremento significativo delle piastrine.

Conclusioni. Il metodo di valutazione tramite valore critico RCV si è dimostrato utile per l'analisi di numerosi conteggi piastrinici. Il 79% delle variazioni totali non sono state significative. L'RCV è stato superato in tutti i casi associati a terapia trasfusionale; tuttavia, l'82% dei pazienti con superamento dell'RCV hanno avuto variazioni con scarso significato clinico o interpretabili in base a condizioni di emodiluizione e/o interferenze nel conteggio piastrinico.

Bibliografia

Smellie WSA. J Clin Pathol 2008;61:419-425.

089

**VALUTAZIONE DI UN ALGORITMO PER "ALLARME MIELODISPLASIA" CON SIEMENS ADVIA 2120**

V. Rocco<sup>3</sup>, M.G. Silvestri<sup>5</sup>, M. Gioia<sup>6</sup>, M. Maconi<sup>4</sup>, D. Tanca<sup>2</sup>, T. Catalano<sup>3</sup>, D. Avino<sup>1</sup>, A. Di Palma<sup>1</sup>, A. Rovetti<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

<sup>2</sup>Ematologia, Citometria e Coagulazione, Osp. Lavagna Lab. Analisi ASL 4 Chiaverese

<sup>3</sup>U.O. Patologia Clinica, A.O. Rummo, Benevento

<sup>4</sup>Medicina di Laboratorio, A.O. "Arcispedale Santa Maria Nuova", Reggio Emilia

<sup>5</sup>Lab. Centralizzato, A.O. Universitaria Policlinico S. Orsola Malpigli, Bologna

<sup>6</sup>Lab. Patologia A.O. "Vincenzo Cervello", Palermo

**Introduzione.** Le sindromi mielodisplastiche (MDS), patologie insorgenti prevalentemente nell'anziano, vengono spesso sospettate per anomalie riscontrate all'esame emocromocitometrico, con diagnosi frequentemente occasionale. Le alterazioni displastiche che possono interessare eritrociti, leucociti e piastrine, determinano aspetti caratteristici evidenti in citometria, per cui è stata valutata la possibilità di oggettivizzare il sospetto di mielodisplasia mediante l'uso di un algoritmo che possa fornire un "allarme" utilizzabile in routine.

**Materiali e Metodi.** Mediante i dati forniti dall'analizzatore Siemens ADVIA 2120, è stato approntato un algoritmo basato su anisocitosi (RDW), allarme blasti ed indici posizionali dei neutrofili che sono influenzati da volume, granuli e attività perossidasi. L'algoritmo è stato testato su circa 60.000 esami emocromocitometrici, raccolti come raw data, provenienti da 6 laboratori italiani, 2230 files di patologie ematologiche non MDS, 386 files relativi a pazienti con MDS, diagnosticati secondo i correnti criteri clinici e laboratoristici.

**Risultati.** Sulla popolazione generale si sono riscontrati 1062 positivi (1,77%) di cui 754 definiti falsi positivi e 308 di pazienti con MDS. Nelle patologie oncoematologiche non MDS sono stati riscontrati 133 (5,96%) positivi (displasia non primitiva) su 2230 valutati. Nei 386 campioni MDS è stato riscontrato l'83% di positività.

**Discussione - Conclusioni.** I dati mostrati, da ritenersi preliminari in quanto l'algoritmo è suscettibile di ulteriore rimodellamento ed affinamento, sostengono l'ipotesi che le alterazioni in corso di MDS siano ben identificabili dall'analizzatore utilizzato. L'algoritmo proposto può evidenziare pazienti mielodisplastici in una popolazione generale routinaria, con buon sensibilità e specificità.

**Bibliografia**

1. Galili N, A Raza Pathogenesis and basic aspects of myelodysplastic syndromes. *Hematology Education* 2009;3:172-176

090

**A PILOT STUDY FOR THE SCREENING OF ALPHA THALASSEMIA IN NEWBORNS BY A NEW HPLC SYSTEM: BIORAD NBS**

C. Ialongo<sup>1</sup>, R. Colletti<sup>1</sup>, I. Antonozzi<sup>1</sup>, P. Ialongo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Sperimentale e Patologia, Università La Sapienza, Roma

The alpha thalassemia results from the alteration or loss of one or more of the four alpha globin genes. In the fetus and newborn a reduced synthesis of alpha globin chains allows the formation of a  $\gamma$ -tetramer (Bart's hemoglobin). The percentage of hemoglobin Bart's may indicate the number of alpha genes that have been lost. We have tested anonymously and randomly the presence of Bart's hemoglobin in 5189 newborn dried blood spots (DBS) of Latium as a possible marker of alpha thalassemia using the HPLC Biorad NBS procedure currently used in newborn screening for sickle cell disease (SCD). The second level was performed by Thin Layer IEF Resolve PerkinElmer. In all the chromatograms were showed a fast-moving peak with a RT between 0.11 and 0.13 seconds. Only in 25 chromatograms with a fast peak (mean area 26%, range 17-48%) the HPLC procedure indicated the presence of Bart's hemoglobin with the acronym FAB\* and FAb\*. These 25 DBS when tested by ISE, showing a fast-moving band in a range of pl 6.21-6.35, were confirmed positive for Bart's hemoglobin. Bart's hemoglobin percentages obtained with the HPLC system were systematically higher than those obtained with the ISE method. Because bilirubin has a RT similar to that of Bart's hemoglobin not be exclude that may cause an increase in of the chromatographic peaks 5164 DBS analyzed by the ISE system not showing a clearly discernible fast-moving band were judged negative, although in all chromatograms was present a peak with a RT between 0.11-0.13 seconds and a mean area of 5% (range 1-16%). The presumed laboratory diagnosis of 25 high level Bart's hemoglobin (0.48%) suggests that the previous data on epidemiology in Latium region must be revised. The retention time on HPLC is reliable, reproducible, with a daily throughput of 280 DBSs, and in many cases superior to conventional hemoglobin electrophoresis for the detection of Bart's hemoglobin.

**Reference**

Michlitsch j, Azimi M, Hoppe C, et al. Newborn screening for hemoglobinopathies in California. *Pediatric Blood & Cancer*. May 2009;52(4):486-490.

091

**ANALISI IN CITOMETRIA A FLUSSO DELLA PROTEINA DI FUSIONE BCR/ABL NEI PROCESSI MIELOPROLIFERATIVI CRONICI E NELLE LEUCEMIE ACUTE E COMPARAZIONE CON LA FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)**

F. Gervasi<sup>1</sup>, L. Carnevale<sup>1</sup>, S. Vlah<sup>1</sup>, C. Giambanco<sup>1</sup>, A. Ferraro<sup>1</sup>, C. Tomaselli<sup>1</sup>, G. Pagnucco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Ematologia, Dip. Oncologia, ARNAS Civico, Palermo

Questo studio qualitativo, ha lo scopo di identificare, in citometria a flusso, su lisato cellulare, la presenza della proteina di fusione BCR-ABL su sangue periferico e aspirati midollari di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica e leucemia acuta, comparando con il saggio genetico convenzionale: "Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)", utilizzando sonde "single fusion dual color" e "dual fusion dual color". In citometria è stato utilizzato il "BCR-ABL Protein Kit (BD Biosciences)". Sono stati valutati 11 campioni di sangue periferico e di aspirato midollare di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica e leucemia mieloide e linfoblastica acuta sia alla diagnosi che durante il follow-up con trattamento farmacologico molecolare; è stato calcolato il cut-off sulla base dei valori ottenuti considerando 20 controlli negativi (10 donatori di sangue e 10 pazienti affetti da emopatie diverse da quelle oggetto di indagine), come controlli positivi sono stati utilizzati lisati di cellule K562 dove la proteina di fusione è costitutivamente espressa. I campioni sono stati acquisiti al citometro "BD FACSCanto II™ (BD Biosciences)" e analizzati con il software "DIVA™ (BD Biosciences)". La correlazione tra la presenza/assenza della proteina BCR-ABL, valutata con l'utilizzo del "BCR-ABL Protein Kit" e la positività/negatività per il cromosoma Philadelphia, valutata con la "Fluorescence in Situ Hybridization", risulta assoluta tranne che in un paziente in cui la FISH è risultata positiva utilizzando la sonda single fusion dual color (±) mentre la determinazione citometrica è stata negativa.

Poiché in citometria a flusso si determina la proteina di fusione, la positività del segnale in interfase potrebbe non essere indice di trascrizione effettiva dall'RNA messaggero alla proteina di fusione. I dati sono al momento assolutamente preliminari e necessitano di ulteriore implementazione, ma si può ritenere che il "BCR-ABL Protein Kit" in citometria a flusso sia un valido strumento di screening per le diagnosi all'esordio di leucemia mieloide cronica e leucemia acuta.

092

**CHARACTERIZATION OF THE LYMPHOCYTIC POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS, THE STEM CELLS AND THE CIRCULATING DENDRITIC CELLS IN BURNED PATIENTS WITH AND WITHOUT SEPSIS**

F. Gervasi<sup>1</sup>, V. Tortorici<sup>1</sup>, L. Carnevale<sup>1</sup>, C. Giambanco<sup>1</sup>, A. Ferraro<sup>1</sup>, S. Vlah<sup>1</sup>, C. Rizzo<sup>1</sup>, G. Pagnucco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Ematologia con T.M.O., Dip. Oncologia, P.O. M. Ascoli, ARNAS Civico, Palermo

<sup>2</sup>Centro Ustioni, ARNAS Civico, Palermo

**Aim.** The purpose of this work is to quantify, in peripheral blood, the Dendritic Cells (DC) in relation to the immune response to the infectious insults under extensive burns of the human body. We have evaluated the normal profile of DC myeloid and DC plasmacytoid, the lymphocytes populations (T-B-NK), regulatory T (T reg) cells and circulating stem cells in healthy, compared with burned subjects evolving toward the sepsis. The study wants to highlight the role of DC as clinical biomarkers in the field of the diagnostic characterization of the burn.

**Methods.** 12 burned patients and 17 healthy controls were studied. Such patients were differentiated statistically with reference to fact that they evolved toward sepsis or not. In our flow cytometry laboratory we have performed a 7-color flow cytometric immunophenotyping on Cyan ADP™ (Beckman Coulter) flow cytometer. The following panel of antibodies was used in all of the cases: CD11cFic, CD123Pe,HLA-DRECD, CD14Pe-Cy.5, CD19Pe-Cy.7, CD3Apc, CD16Apc-Cy7; CD209Fitc, CD86PE, CD14ECD, CD83Pe-Cy5, CD19Pe-Cy7, CD3Apc, CD16Apc-Cy7; CD4Fitc, CD3PE, CD45ECD, CD20+CD19Pe-Cy5, CD8Pe-Cy7, CD56Apc, CD16Apc-Cy7; CD45Fitc, CD25Pe, CD4TxR, CD8Pe-Cy7, CD3Apc; TcrγδFitc, TcrαβPe, CD45ECD, CD34Apc, CD3Apc-Cy7. The antibodies were purchased from BD Biosciences, Beckman Coulter, Dako and Invitrogen.

**Results.** In the patients with sepsis we have found an increase of dendritic cells (LIN-DR+), CD209+, of the hematopoietic stem cells (CD34+) and of the the TCRγ/δ T lymphocytes. Further, we have observed a decrease of percentage of the dendritic subpopulations: DR+CD123+CD11c- (Plasmacytoid) and DR+CD123-CD11c+ (Myeloid,)and of NK cells.

**Conclusion.** These preliminary data could suggest that increase of DC indicate the immunologic response that a part of burned patients activate during an infectious process. Such events seem linked with the development of the Sepsis and they point out the determinant role of the dendritic cells and the action of the cells NK in the evolution of the infection toward the sepsis.

093

### ESAME EMOCROMOCITOMETRICO NELLO SCREENING DEI SOGGETTI CON LINFOCITOSI MONOCLONALE B

A. Cappellani<sup>1</sup>, B. Cremonesi<sup>1</sup>, F.M. Biella<sup>1</sup>, F. Cappellini<sup>1</sup>, F. Sciarini<sup>1</sup>, C. Parma<sup>1</sup>, G. Limonta<sup>1</sup>, S. Signorini<sup>1</sup>, P. Tramacere<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Ospedale di Desio, Desio (MB)

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale (DIMS), facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano-Bicocca Monza (MB)

Introduzione. Con il termine linfocitosi monoclonale B (MBL) si definisce il processo di proliferazione monoclonale di cellule B nel sangue periferico in soggetti con linfocitosi tra 4.0 e 5.0 x 10<sup>3</sup>/μL. I linfociti B monoclonali di questi pazienti presentano un fenotipo caratteristico per Leucemia linfatica cronica (LLC). La letteratura evidenzia che soggetti affetti da MBL hanno alta probabilità di evolvere verso un processo linfoproliferativo cronico del tipo LLC.

Scopo. Valutare la frequenza dei pazienti con possibile MBL da studiare per evidenziare l'aumento dei linfociti B e la monoclonalità κ o λ.

Materiali e Metodi. Nel laboratorio analisi dell'ospedale di Desio sono stati raccolti gli esami emocromocitometrici eseguiti da Aprile a Luglio del 2009. Gli emocromi analizzati dai contaglobuli XE-2100 (Dasit), sono stati sottoposti ad un filtro di regole di validazione automatico implementate sul software DMS (Dasit) con lo scopo di selezionare i soggetti di età > 40 anni con linfocitosi tra 4.0-5.0 x 10<sup>3</sup>/μL. I casi sospetti per MBL sono stati indagati mediante analisi citofluorimetrica.

Risultati. Sul totale di 18.517 soggetti con esame emocromocitometrico, 55 (3‰) sono stati bloccati per linfocitosi. Dopo valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico e delle informazioni sanitarie dall'archivio elettronico, sono stati esclusi 28 soggetti (51% dei casi bloccati) per linfocitosi dovuta ad altre patologie (19 infezioni virali, 5 malattie autoimmuni e 4 chemioterapia). Tra i 27 soggetti restanti, sospetti per MBL, (49% dei casi bloccati), 5 erano primi riscontri di linfocitosi, da rivalutare a distanza di 3 mesi; 22, con linfocitosi, da almeno 3 mesi sono stati ulteriormente indagati per la diagnosi di MBL; di questi: 10 (45% dei sospetti MBL; 18% dei casi bloccati) sono risultati MBL; altri 10 hanno mostrato valori di T/B normali e 2 un aumento dei linfociti T.

Conclusioni. Il sistema di regole automatico è risultato efficace nel selezionare i casi sospetti MBL, che con alta probabilità evolvono verso LLC. 10 Soggetti (45% dei 27 sospetti) sono risultati affetti da MBL. La percentuale del 18% di MBL sui 55 casi bloccati per linfocitosi, concorda con la letteratura.

#### Bibliografia

Andy C. Rawstron et al. NEJM, 2008;359:6.

094

### I DETERMINANTI DELLA VELOCITÀ DI ERITROSEDIMENTAZIONE: CORRELAZIONE CON L'AGGREGAZIONE ERITROCITARIA E LA VISCOSITÀ EMATICA

E. Piva<sup>1</sup>, M. Arzenton<sup>1</sup>, V. Krajcar<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

Introduzione. La velocità di eritrosedimentazione (VES), tradizionalmente rappresentata come lunghezza di una sedimentazione eritrocitaria ottenuta in condizioni standardizzate, è correlata all'aggregazione dei globuli rossi che precede la formazione dei rouleaux.

Materiali e Metodi. IL TEST1TH è un analizzatore automatizzato per la determinazione della VES operante in un sistema chiuso utilizzando campioni anticoagulati con EDTA. Il principio di misurazione è lo studio della capacità di aggregazione dei globuli rossi con la telemetria. Un algoritmo matematico converte i dati grezzi ottenuti dalla valutazione dei segnali in densità ottica in valori di velocità di sedimentazione correlabili a quelli ottenuti con il metodo di Westergren. Il TEST1TH è in grado di fornire il parametro di aggregazione eritrocitaria ed un parametro di valutazione della viscosità ematica. Abbiamo condotto uno studio preliminare in 20 pazienti affetti da processi flogistici di varia gravità e di variabile etiologia valutando i valori di VES, i parametri di aggregazione eritrocitaria, di viscosità ematica in relazione al fibrinogeno, proteine plasmatiche, albumina, alfa-globuline, beta-globuline, gamma-globuline, concentrazione di emoglobina ed ematocrito.

Risultati. Il coefficiente di determinazione con la regressione multipla è R<sup>2</sup>=0,991, R<sup>2</sup> aggiustato =0,967, il coefficiente di correlazione multiplo=0,995, mentre l'analisi della varianza ha permesso di ottenere un valore di P=0,005. Lo studio preliminare dimostra una buona correlazione della VES con l'aggregazione eritrocitaria (r=0,97), con la viscosità ematica (r=0,40), con il fibrinogeno (r=0,54) e con l'emoglobina (r=-0,52).

Conclusioni. La velocità di eritrosedimentazione è condizionata da determinanti che interagiscono con l'aggregazione eritrocitaria in misura maggiore di quelli che influenzano la viscosità ematica.

#### Bibliografia

Cha CH, Park CJ, Cha YJ et al. Erythrocyte sedimentation rate measurements by TEST 1 better reflect inflammation than do those by the Westergren method in patients with malignancy, autoimmune disease, or infection. Am J Clin Pathol 2009;131:189-94.

095

**INDICE DI PRODUZIONE RETICOLOCITARIA NELLA DIAGNOSI DELLE ANEMIE**

B. Cremonesi<sup>1</sup>, A. Cappellani<sup>1</sup>, G. Limonta<sup>1</sup>, F.M. Biella<sup>1</sup>, F. Cappellini<sup>1</sup>, S. Signorini<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio (MB)

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale (DIMS) Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano-Bicocca, Monza (MB)

Introduzione. L'indice di produzione reticolocitaria (RPI) fornendo una stima della produzione midollare di globuli rossi, permette di distinguere le anemie ipoproliferative o da difetti della maturazione da quelle emolitiche o emorragiche (1). L'RPI è così calcolato:  $[Ret \times (Ht/Htatt)]/F$  dove Ret = conta reticolocitaria (%); Ht = ematocrito (%), Htatt = l'ematocrito atteso sulla base dell'età e del sesso; F = fattore di correzione del tempo di maturazione dei reticolociti secondo l'ematocrito del soggetto (2).

Scopo. Valutare l'efficacia dell'indice IRP nella diagnosi delle anemie individuando il valore soglia che meglio discrimina le anemie ipoproliferative/dismaturative (AID) dalle anemie emolitiche/emorragiche (AEE).

Materiali e Metodi. Dall'archivio elettronico del nostro laboratorio sono stati consecutivamente considerati (1 gennaio 2005 - 30 giugno 2009), 1334 soggetti con diagnosi di anemia alla dimissione dal nostro ospedale e di questi è stato considerato il primo esame emocromocitometrico eseguito durante il ricovero. I soggetti sono stati suddivisi, secondo la diagnosi ISTAT di dimissione, nel gruppo con anemia AID (1229 pazienti) e in quello con anemia AEE (114 pazienti). L'analisi delle curve ROC è stata usata per individuare il valore soglia di RPI che meglio discrimina i due gruppi.

Risultati. Il valore soglia di RPI che meglio discrimina i due gruppi è 0.87 con Sensibilità del 73%, Specificità del 76%, Valore Predittivo Positivo di 20% e Valore Predittivo Negativo di 3% (per il valore di Probabilità Pre-test di AEE dell'8% relativa alla popolazione afferente al nostro ospedale).

Conclusioni. I valori di Sensibilità, Specificità, Valore Predittivo Positivo e Valore Predittivo Negativo del cut-off di 0.87 di RPI, per la discriminazione di AEE da AID, ne giustifica il suo utilizzo insieme agli altri indici ematici tradizionali nella diagnosi differenziale delle anemie.

**Bibliografia**

1. Fauci AS et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17ed. 2009.
2. Murali MR et al. N Engl J Med, 2006;355:2772-9.

096

**INTEGRAZIONE DI EMOCITOMETRIA, MORFOLOGIA E CITOFLUORIMETRIA NELLA IDENTIFICAZIONE DI FORME IBRIDE BASOFILI-EOSINOFILI**

D. Avino<sup>1</sup>, A. Di Palma<sup>1</sup>, A. Rovetti<sup>1</sup>, I. Caliendo<sup>1</sup>, B. Talento<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

Introduzione. In alcune patologie mieloproliferative sono descritti elementi mieloidi contenenti sia granuli eosinofili specifici che granulazioni grossolane rosso-scuro simili a quelle dei basofili; tali cellule, di difficile classificazione, sono definite ibridi basofili-eosinofili (Weil, Hrisinko, 1987). Viene descritta la possibilità di identificare le stesse, con approccio citofluorimetrico semplificato, in una sindrome mielodisplastico-mieloproliferativa.

Materiali e Metodi. Un campione di una paziente con sindrome mielodisplastico-mieloproliferativa, è stato esaminato con SIEMENS ADVIA 2120, SYSMEX TOA XE 2100, COULTER LH 780. Il fenotipo leucocitario è stato valutato con citofluorimetro COULTER Fc500 e single tube "Cytodiff" a 6 marcatori/5 colori: CD36-FITC/CD2-PE+CRTH2-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy. E' stata effettuata valutazione microscopica.

Risultati. I tre analizzatori hanno mostrato concordemente: WBC 6.000 / $\mu$ L, Basofili 5%, Eosinofili 2%, nonché allarme blasti. L'esame morfologico ha evidenziato: Neutrofili 45%, Linfociti 10%, LGL 14%, Monociti 7%, Eosinofili 5%, Basofili 10%, Blasti 9%. La valutazione con Cytodiff ha evidenziato una popolazione di cellule CRTH2+ corrispondente ad una quota eosinofila pari al 17%. Il CD45 è risultato normo-espresso sul 10% degli eosinofili e a più bassa espressione sul 7%.

Discussione. Nella malattie mieloproliferative il passaggio graduale da una fase maturativa all'altra può rendere difficile l'attribuzione dei singoli elementi ad una classe cellulare piuttosto che a quella che la precede o la segue nella differenziazione. Le cosiddette forme ibride basofili-eosinofili possono essere considerate semplice espressione morfologica di una fase precoce della granulogenesi eosinofila. La valutazione citofluorimetrica semplificata ha consentito di identificare la linea di appartenenza della popolazione cellulare in questione, superando le incertezze diagnostiche emocitometriche e morfologiche; sono state differenziate inoltre nella quota eosinofila 2 popolazioni con diverso grado di maturazione, verosimilmente alla base dell'errore morfologico.

**Bibliografia**

- Faucher et al. "6 markers/5colors extended white blood cell differential by flow cytometry CytometryA 2007 nov;71(11):934-44.

097

### L'ANALISI CITOMETRICA CON ADVIA 2120 SUPPORTA LA DIAGNOSI MORFOLOGICA DI PICNOCITOSI INFANTILE

C. Esposito<sup>1</sup>, G. Amendola<sup>2</sup>, R. De Concilio<sup>2</sup>, G. D'Urzo<sup>2</sup>, A. Rovetti<sup>1</sup>, B. Talento<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

<sup>2</sup>Divisione di Pediatria P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

Introduzione. La picnociotisi infantile è una rara forma di anemia emolitica neonatale (Tuffy 1959), caratterizzata dalla presenza di picnociti allo striscio ematico. Scopo del lavoro è stata la valutazione strumentale di pazienti con questa patologia per evidenziare aspetti citometrici peculiari che possano consentire un indirizzo diagnostico precoce

Materiali e Metodi. Sono stati valutati 6 neonati affetti da ittero e/o anemia alla 2-3 settimana di vita, con diagnosi morfologica di picnociotisi infantile. Sono stati effettuati emocromo con analizzatore SIEMENS ADVIA 2120, HPLC emoglobina, test di fragilità osmotica eritrocitaria, Coombs diretto, attività G6PDH e PK, profilo biochimico. Risultati. HPLC emoglobina, test di fragilità osmotica eritrocitaria, Coombs diretto, attività G6PDH e PK, profilo biochimico sono risultati normali. La morfologia microscopica ha evidenziato per tutti i neonati una alta percentuale di eritrociti spiculati e contratti, simili agli acantociti (picnociti). La valutazione emocitometrica ha mostrato incremento delle emazie ipercromiche con asimmetria conseguente della curva di concentrazione emoglobinica corpuscolare e normale distribuzione della curva di concentrazione emoglobinica corpuscolare reticolocitaria. Tale pattern è risultato peculiare e differente da anemie neonatali di altra origine

Discussione - Conclusioni. La diagnosi di picnociotisi infantile è infrequente e richiede valutazione accurata della morfologia eritrocitaria e l'esclusione di anemia di altra origine. Le caratteristiche emocitometriche di incremento di emazie ipercromiche e di anomalia della curva di distribuzione di concentrazione emoglobinica corpuscolare eritrocitaria, con normalità della curva di distribuzione della concentrazione di emoglobina corpuscolare reticolocitaria, costituiscono un utile supporto diagnostico di primo livello e suggeriscono il ruolo etiologico di un fattore extra-corpuscolare periferico ancora sconosciuto nella picnociotisi infantile, che non determina alterazioni reticolocitarie ma eritrocitarie.

#### Bibliografia

Eyssette-Guerreau S. Infantile pyknocytosis: a cause of haemolytic anaemia of the newborn Br J Haematol 2006 May;133(4):439-42.

098

### NUOVI PARAMETRI ERITROCITARI E RETICOCITARI DI COULTER LH780

P. De Luca<sup>1</sup>, O.C. Fogliani<sup>1</sup>, S. Messina<sup>1</sup>, G. Randazzo Papa<sup>1</sup>, M. Restuccia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero G. Fogliani, Milazzo

Introduzione. Il Laboratorio di Ematologia può oggi avvalersi di ulteriori nuovi parametri eritrocitari e reticolocitari che correttamente integrati con i riscontri clinici e gli altri dati biochimici possono essere utili per la definizione ed il monitoraggio delle anemie.

Scopo del lavoro. Con questo studio abbiamo voluto analizzare, seppure in maniera preliminare, i dati dei parametri MAF (microcytic anemia factor), RSF (red size factor), LHD (low haemoglobin density) forniti dall'analizzatore COULTER LH 780 relativi alla popolazione del nostro bacino di utenza.

Materiali e Metodi. Abbiamo analizzato (COULTER LH 780) 184 campioni che in base agli usuali parametri ematologici e biochimici (Creatinina, Hgb, ferro, transferrina, ferritina, % saturazione transferrina, HbA<sub>e2</sub>) sono stati suddivisi nei seguenti gruppi: 46 Normali (CTRL), 46 Anemia da carenza di ferro (IDA), 46 Anemia in Insufficienza renale (CKD) e 46  $\beta$ -Talassemia eterozigosi ( $\beta$ -TAL). Per la elaborazione statistica dei dati ci siamo avvalsi del XL-STAT.

Risultati. I valori dei parametri oggetto del nostro studio sono stati i seguenti: MAF media (SD): CTRL 13.21(1.00); IDA 7.19(1.43); CKD 10.15(1.85);  $\beta$ -Tal 7.84(0.96)- RSF media (SD): CTRL 98.56(3.72); IDA 91.96(11.87); CKD 107.03(10.25);  $\beta$ -Tal 79.19(3.43)-LHD media (SD): CTRL 3.96(1.60); IDA 21.92(20.08); CKD 10.73(9.73);  $\beta$ -Tal 23.77(8.20).

L'elaborazione statistica (comparazione multipla a coppie con correzione di Bonferroni) evidenzia differenze significative tra i vari parametri nell'ambito dei quattro gruppi: in MAF e LHD la differenza è parziale, in RSF è invece completa.

Discussione. La differenziazione dei valori medi nell'ambito dei vari gruppi esaminati suggerisce, così come confermato da altri studi presenti in letteratura, l'utilità che i parametri MAF, RSF, LHD possono avere nello screening e nell'inquadramento diagnostico delle anemie, in special modo negli stati preanemici, nelle carenze marziali funzionali, nella valutazione dell'efficacia delle terapie antianemiche.

#### Bibliografia

Urrechaga E. (2008) Clinical utility of the new beckman-coulter parameter red blood cell size factor in the study of erythropoiesis International Journal of Laboratory Hematology

099

**PROBLEMI DI IDENTIFICAZIONE DI EOSINOFILI CON DEFICIT DI MIELOPEROSSIDASI DA PARTE DI TRE DIFFERENTI EMOCITOMETRI**

D. Avino<sup>1</sup>, A. Di Palma<sup>1</sup>, A. Rovetti<sup>1</sup>, G. Odierna<sup>1</sup>, B. Talento<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

Introduzione. Il deficit di mieloperossidasi eosinofila è stato più volte descritto in letteratura, in relazione ad emocitometri utilizzando reazione citochimica MPO per la formula leucocitaria. Scopo del lavoro è stata la valutazione della capacità di identificare gli eosinofili con deficit di perossidasi con tre diversi analizzatori ematologici e con citofluorimetria semplificata.

Materiali e Metodi. E' stato esaminato un campione di sangue con SIEMENS ADVIA 2120, SYSMEX TOA XE 2100 e BECKMAN COULTER LH 780. È stata effettuata valutazione microscopica. È stato valutato il fenotipo leucocitario con citofluorimetro COULTER Fc500 con single tube "Cytodiff", a 6 marcatori/5 colori: CD36-FITC/CD2-PE+CRTH2-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy.

Risultati. ADVIA 2120 e LH 780 hanno fornito valori di Wbc di 3000/μL, con 0,0 EO/μL mentre XE-2100 non ha espresso formula leucocitaria. Tutti gli analizzatori hanno comunque evidenziato anomalie leucocitarie richiedenti approfondimento morfologico: ADVIA 2120 ha presentato sul citogramma volume/perossidasi una doppia popolazione nell'area dei monociti; LH 780 ha mostrato dispersione della nuvola dei neutrofili verso l'area degli eosinofili con aumento della deviazione standard del volume dei neutrofili; XE-2100 ha mostrato sul citogramma volume/side scatter estensione dell'area dei neutrofili verso quella degli eosinofili. L'esame morfologico ha evidenziato una popolazione di eosinofili pari al 20% morfologicamente normale. Il Cytodiff ha separato una popolazione di cellule CRTH2+, corrispondente alla quota eosinofila, pari al 22%.

Conclusioni. Le alterazioni cellulari determinanti deficit di MPO eosinofila possono essere complesse e inficiare la corretta identificazione degli eosinofili anche da parte di tecnologie che non prevedono l'utilizzo della reazione citochimica della perossidasi. Quote di eosinofili significative forniscono tuttavia alterazioni dei citogrammi strumentali. Gli eosinofili del paziente, senza alterazioni morfologiche visibili, erano correttamente identificati mediante screening citofluorimetrico con Cytodiff.

**Bibliografia**

Faucher et al. "6 markers/5colors extended white blood cell differential by flow cytometry CytometryA 2007 nov;71(11):934-44

100

**VALUTAZIONE DEL RUOLO DELL'ELETTROFORESI CAPILLARE NELL'IDENTIFICAZIONE DEL PATTERN EMOGLOBINICO RAPPORATO ALLE TECNICHE UTILIZZATE IN ROUTINE E SUO IMPATTO ORGANIZZATIVO**

M. Varagnolo<sup>1</sup>, S. Altinier<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, C. Artusi<sup>1</sup>, M. Ivanova<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Università di Padova

Scopo. Verificare il possibile ruolo dell'elettroforesi capillare (CE) nell'identificazione dei differenti patterns emoglobinici in confronto alle tecniche utilizzate nella routine, valutandone l'impatto organizzativo

Materiali e Metodi. 135 campioni di sangue intero eparinato sono stati sottoposti alle indagini di routine rappresentate da separazione e quantificazione delle emoglobine in HPLC (Adams A1C HA-8160 Menarini), associata ad elettroforesi a pH alcalino su gel di agarosio eseguita su Hydrasys 1 (Sebia) ed eventuale elettroforesi a pH acido in presenza di varianti. Questi stessi campioni sono stati quindi analizzati mediante CE (Capillarys Sebia, Francia). Il confronto è stato eseguito sia in termini di quantificazione delle emoglobine (HPLC vs CE), sia in termini di corretta identificazione del pattern emoglobinico (HPLC + elettroforesi a pH alcalino + eventuale elettroforesi a pH acido vs CE).

Risultati. Regressione Passing & Bablok (CI 95% slope e intercetta)

HbA2 n=134 CE=1.00HPLC + 0.50 (CI 95%: da 0.83 a 1.00 e da 0.50 a 0.80);

HbF n=40 CE=1.18HPLC-0.59 (CI 95%: da 1.15 a 1.23 e da -0.68 a -0.51);

Hbvarianti n=22 CE=1.08HPLC-0.83 (CI 95% : da 1.00 a 1.15; e da -5.22 a 3.40).

Nella quantificazione di HbA2 il bias tra i due metodi è concentrazione indipendente, mentre HbF presenta un bias concentrazione dipendente, imputabile al minore potere risolutivo del metodo in CE alle basse concentrazioni. Nella quantificazione delle varianti, il bias risulta non significativo e indipendente dalle concentrazioni.

Dal punto di vista interpretativo: 1 campione risultava misclassificato dall'HPLC per la presenza di HbS pari al 6%. In un solo campione la percentuale di HbF, quantificata in HPLC come superiore all'intervallo di riferimento, risultava per CE normale. Relativamente ad HbA2 in 6 campioni la quantificazione risultava discordante rispetto al solo intervallo di riferimento, ma ininfluente dal punto di vista interpretativo.

Conclusioni. CE Sebia da solo è in grado di fornire prestazioni accurate attualmente garantite solo dall'impiego contestuale di HPLC + elettroforesi a pH alcalino, consentendo quindi una semplificazione del flusso di lavoro e, in alcuni casi, una più corretta interpretazione dei dati.

101

### ASPETTI ERITROPOIETICI IN PAZIENTI MIELODISPLASTICI RISPONDENTI A TERAPIA CON ERITROPOIETINA, LENALIDOMIDE, 5 AZACITIDINA

A. Rovetti<sup>1</sup>, A. Di Palma<sup>1</sup>, D. Avino<sup>1</sup>, A. Di Feo<sup>1</sup>, M.G. Pirofalo<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, A. Sabatino<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

**Introduzione.** Diverse opzioni terapeutiche consentono oggi nelle sindromi mielodisplastiche (MDS) l'incremento dei livelli di emoglobina. L'emocitometria ha la capacità di valutare aspetti qualitativi di eritrociti e reticolociti, indicanti se l'eritropoiesi che sostiene tale incremento abbia aspetti displastici o normali. Il Volume Corpuscolare Medio reticolocitario (MCVr) è ritenuto un dato indicativo di eritropoiesi displastica (Bowen 1994, Liung 2004).

**Scopo del lavoro** è stata la valutazione dell'eritropoiesi in pazienti MDS rispondenti a differenti tipi di terapia.

**Materiali e Metodi.** Sono stati esaminati 23 pazienti rispondenti a terapia secondo i criteri IWG (Cheson 2006):

10 con eritropoietina,

11 con 5 azacitidina,

2 (sindrome 5q-) con lenalidomide.

I dati sono stati ottenuti al baseline e dopo 6 mesi di terapia.

Sono stati valutati emoglobina e MCV reticolocitario (fl), ottenuti con SIEMENS ADVIA 2120.

**Risultati.** Tutti i pazienti valutati sono divenuti trasfusione indipendenti a 6 mesi.

14/23 pazienti valutati hanno mostrato normali livelli sierici di folati ed olotranscobalamina.

L'MCV reticolocitario ha mostrato incremento statisticamente significativo dopo 6 mesi nei pazienti in terapia con eritropoietina (119,7 vs 126,4) e 5 azacitidina (128,5 vs 132,3), con valori medi sempre superiori alla norma (98,8-116,4).

I 2 pazienti con MDS 5q- in terapia con lenalidomide hanno mostrato diminuzione di MCV reticolocitario (118,7 vs 133,1), con contemporanea diminuzione delle metafasi 5q- (- 25% e - 80% rispettivamente).

**Discussione.** La persistenza di MCV reticolocitario elevato e l'incremento dopo terapia con eritropoietina e 5 azacitidina suggeriscono che la risposta ematologica sia dovuta ad un migliorata efficienza di cloni displastici.

La diminuzione dell'MCV reticolocitario dopo terapia con lenalidomide, insieme alla riduzione di presenza del clone patologico 5q-, suggerisce la partecipazione di cloni normali alla ripresa eritropoietica.

I dati dimostrano come l'emocitometria possa fornire indicazioni utili al di là di quanto generalmente utilizzato in clinica nel monitoraggio di alcune terapie.

**Bibliografia**

1. Cazzola M. Myelodysplastic disorders-coping with ineffective Hematopoiesis N Engl J Med 2005;352:536-538.

102

### DIAGNOSI DI LINFOMA A CELLULE B MONOCITOIDE: INTEGRAZIONE TRA EMOCITOMETRIA, MORFOLOGIA, CITOFUORIMETRIA

A. Di Palma<sup>1</sup>, D. Avino<sup>1</sup>, A. Rovetti<sup>1</sup>, G. Odierna<sup>1</sup>, B. Talento<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno

**Introduzione.** La corretta identificazione di cellule patologiche non è un obiettivo pienamente raggiunto in emocitometria. Microscopia e citofluorimetria indicano linea di appartenenza e grado di maturazione di una popolazione. Viene qui descritto un caso di linfoma la cui diagnosi ha richiesto l'integrazione di morfologia, citometria e citofluorimetria.

**Materiali e Metodi.** È stato esaminato un campione di una paziente di anni 61 con SIEMENS ADVIA 2120, SYSMEX TOA XE 2100 e BECKMAN COULTER LH 780. È stato valutato fenotipo leucocitario con citofluorimetro COULTER Fc500 con single-tube "Cytodiff", a 6 marcatori/5colori: CD36-FITC/CD2-PE+CR-TH2-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy e con citofluorimetria tradizionale; è stata effettuata valutazione microscopica.

**Risultati.** La paziente presentava leucocitosi (WBC 19.000/ $\mu$ L), anemia (Hb 8,7g/dl) e piastrinopenia (PLT 79.000/ $\mu$ L). Tutti gli strumenti hanno evidenziato una popolazione anomala identificata come Luc (14400/ $\mu$ L) dall'ADVIA 2120, come Monociti (12400/ $\mu$ L) dal LH 780 e come Other (13890/ $\mu$ L) dall'XE-2100. L'esame morfologico ha evidenziato una popolazione patologica (80%) in parte linfoide (piccole dimensioni; cromatina parzialmente addensata) ed in parte di aspetto monocitoide (nucleo convoluto, ampio citoplasma debolmente basofilo, spesso vacuolato). Cytodiff ha evidenziato una popolazione (65%) di cellule B (CD19+) a normale espressione di CD45, indicativa di fenotipo maturo. La citofluorimetria tradizionale ha evidenziato una popolazione patologica (80%) di tipo linfoide B CD34- CD5-, CD19+, CD20+, CD22+, HLA DR+, CD71+, CD11c+, SmlgK+, TdT-.

**Conclusioni.** L'emocitometria ha evidenziato una popolazione leucocitaria anomala non univocamente identificata. La morfologia ha confermato il dato, fornendo un orientamento in senso linfoide- monocitario.

La citofluorimetria semplificata ha definito la popolazione a fenotipo B maturo.

La citofluorimetria classica ha evidenziato una popolazione linfoide indicativa di linfoma a cellule B.

L'integrazione di emocitometria, morfologia e citofluorimetria ha fatto porre diagnosi di linfoma a cellule B monocitoide.

**Bibliografia**

Faucher et al. 6 markers/5colors extended white blood cell differential by flow cytometry Cytometry A 2007 nov;71(11):934-44.

103

**ESPRESSIONE DELLA PROTEINA ZAP-70 IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

R. Gigli<sup>1</sup>, G. Niro<sup>1</sup>, M. Magri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Medicina di Laboratorio Ospedale A. Cardarelli ASREM Campobasso.

ZAP-70 è una proteina con attività tirosinchinasi strutturalmente correlata con le chinasi della famiglia Src associate al complesso recettoriale del TCR dove mediano la trascrizione all'interno della cellula del segnale originato dalla stimolazione di quest'ultimo. ZAP-70 è espressa in grandi quantità oltre che sui linfociti T anche sugli NK e in misura ridotta sui linfociti B. Particolare importanza ha avuto lo studio dell'espressione intracitoplasmatica della ZAP-70 nella LLC dove gioca un ruolo di vero e proprio indice prognostico indipendente di progressione di malattia. Materiali e metodi. Diverse sono le tecniche per la determinazione di ZAP-70: microarray, immunistochemica, immunoblotting e citometria a flusso. È la citofluorimetria la tecnica da noi utilizzata per misurare ZAP-70. La metodica presenta diverse difficoltà: quali il trattamento di fissazione e permeabilizzazione essendo ZAP-70 una molecola intracitoplasmatica; la bassa espressività; la scelta del gating strategy di lettura. La procedura da noi adottata prevede un'incubazione del campione con un mix di monoclonali (CD3 PE, CD16 RPE, CD19 ECD), successivo trattamento di fissazione e permeabilizzazione, alla fine del quale si aggiunge ZAP-70. La lettura al citofluorimetro è impostata secondo la procedura di Crespo modificato che utilizza come controllo positivo i linfociti T presenti nel campione stesso del paziente affetto da LLC. Il valore cutoff utilizzato è del 20%. ZAP-70 è un marker prognostico importante nella LLC. Nel nostro laboratorio dopo esecuzione del profilo immunofenotipico classico per definire la natura dei linfociti patologici eseguiamo il dosaggio di ZAP-70 in tutti i casi di LLC. I casi analizzati presentano una frequenza di positività alla ZAP-70 del 18,52%.

**Bibliografia**

1. Rassenti et al. N Engl J Med 2004;351:893.
2. Crespo et al. N Engl Med 2003;348:1764-1775.
3. Orchard et al. Lancet 2004;363:105-111.

104

**INTERFERENZA DELLA BETA-TALASSEMIA SULLA DETERMINAZIONE DELL'HB A1C**

M. Caldora<sup>1</sup>, A. Amazzini<sup>1</sup>, R. Brino<sup>1</sup>, S. Fontanarosa<sup>1</sup>, M. Giuliano<sup>1</sup>, M. Mucciardi<sup>1</sup>, R. Napolitano<sup>1</sup>, P. De Luca<sup>2</sup>, M. D'Amora<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. Specialistico di Ematologia P.O. S. Giovanni Bosco, ASL NA1

<sup>2</sup>Medicina Nucleare P.S.I. Elena D'Aosta, ASL NA1

<sup>3</sup>U.O.C. di Patologia Clinica P.O. S. Giovanni Bosco, ASL NA1

**Introduzione.** L'emoglobina glicata, Hb A1C, è il gold standard per la valutazione del controllo glicemico a medio e lungo termine nei soggetti diabetici. Il glucosio ematico, infatti, si lega ai residui valinici terminali delle  $\beta$  catene dell'emoglobina adulta attraverso una reazione non enzimatica irreversibile. Nei soggetti portatori di  $\beta$  talassemia, la ridotta o assente sintesi di  $\beta$  catene condiziona il processo di glicazione dell'Hb A determinando una diminuzione della concentrazione di Hb A1C.

**Scopo.** Valutare l'interferenza della  $\beta$  talassemia eterozigote sulla misura dell'Hb A1C rapportando i valori riscontrati in un gruppo di soggetti non diabetici-non  $\beta$  talassemici a quelli di un gruppo di non diabetici-  $\beta$  talassemici. **Materiali e Metodi.** Applicando l'algoritmo diagnostico-differenziale elaborato per il nostro laboratorio, abbiamo analizzato 300 campioni di sangue, di cui 74 sono risultati eterozigoti per la  $\beta$  talassemia. Su tutti i campioni di sangue abbiamo misurato l' Hb A1C con il metodo della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC Variant I Biorad).

**Risultati.** Il valore medio dell'Hb A1C dei soggetti  $\beta$  talassemici non diabetici (3.1- 4.8%, M = 3.95%) è risultato inferiore al valore medio normale di riferimento del nostro laboratorio (4.8- 6.2%, M = 5.5%).

**Conclusioni.** Il nostro studio dimostra che nei portatori di  $\beta$  talassemia il dosaggio dell' Hb A1C risulta sottostimato rispetto ai soggetti normocitemici per cui è un indice meno affidabile nel monitoraggio del diabete; pertanto, presso il nostro laboratorio, sono in corso studi sull'interferenza della  $\beta$  talassemia sulla misura dell'Hb A1C nei soggetti diabetici al fine di valutare quanto la sottostima del valore dell'analita possa comportare errore terapeutico in questa categoria di pazienti.

105

### STUDIO SUL VALORE PREDITTIVO DELL'ALLARME "ERITROBLASTI" IN AUTOMAZIONE IN LABORATORIO D'URGENZA

M.P. D'Errico<sup>1</sup>, A. Monetti<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi d'Urgenza, Osp. A. Perrino, Brindisi

La disponibilità di analizzatori ematologici di ultima generazione, in grado di segnalare la presenza di eritroblasti (NRBC) nel sangue periferico, consente attualmente anche al Lab. d'urgenza di fornire informazioni tempestive in questo senso.

Obiettivo di questo studio è la verifica della corrispondenza tra conteggio automatizzato degli NRBC fornito dall'analizzatore Coulter LH750 in uso presso il nostro laboratorio ed i valori ottenuti con il metodo di riferimento in microscopia ottica.

Materiali e Metodi. Abbiamo selezionato 100 campioni raccolti in K+EDTA con allarme NRBC+ in un range compreso tra 2-50%; il conteggio automatico è stato ottenuto con analizzatore Coulter LH750, la valutazione microscopica è stata condotta secondo le linee guida NCCLS H20-A1 da due operatori. La stessa procedura è stata eseguita su 20 campioni di controllo senza allarme NRBC, selezionati sulla base di una pregressa o presunta positività.

Risultati. Abbiamo ottenuto una buona correlazione tra metodo automatico e revisione microscopica:  $R^2=0.818$  ( $y=0.9596x-1,3286; N=100$ ); sensibilità 95%, valore predittivo positivo 74%, specificità 39%. Dall'analisi ulteriore dei dati è emerso che circa il 76% dei campioni FP è compreso nella popolazione con valori NRBC+<3% e, pertanto, abbiamo ricalcolato i parametri suddetti elevando il cut off decisionale al 3% (N=60), ottenendo i seguenti risultati: valore predittivo positivo 92%, specificità 77%. Il calo della specificità è principalmente dovuto alla presenza di macropiastrine, aggregati piastrinici o cellule apoptotiche che causano interferenza nella lettura automatica generando allarme NRBC+ a basse conte.

Nella pop. controllo negativo 3 casi sono risultati FN per la presenza di rari NRBC, al di sotto del limite di sensibilità dello strumento: valore predittivo negativo 85%.

Conclusioni. La nostra esperienza ha evidenziato che il conteggio automatico NRBC risulta accurato e preciso in confronto al metodo microscopico di riferimento fissando un cut off decisionale pari al 3%; a basse conte il metodo automatico risente delle interferenze dovute ad alcune anomalie morfologiche e richiede molta accortezza nella refertazione del dato numerico, possibilmente attraverso una verifica microscopica.

#### Bibliografia

Igout J, Clin Lab Haem, 2004;26:1-7.

106

### APPROPRIATEZZA CLINICA TRASFUSIONALE DI EMOCOMPONENTI NEI REPARTI DI MEDICINA DELL'A.O. "TREVIGLIO-CARAVAGGIO"

R. Cecere<sup>1</sup>, E. Agostinelli<sup>2</sup>, M. Piovesan<sup>1</sup>, A. Vitali<sup>3</sup>, A. Vernocchi<sup>4</sup>, A. Rosti<sup>2</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi, Osp. Civile, San Giovanni Bianco (BG)<sup>2</sup>Servizio di Medicina Trasfusionale e di Ematologia, Osp. Treviglio-Caravaggio, Treviglio (BG)<sup>3</sup>Lab. Analisi, Osp. SS. Trinità, Romano di Lombardia (BG)<sup>4</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Osp. Treviglio-Caravaggio, Treviglio (BG)

L'appropriatezza clinica nell'uso di emocomponenti rappresenta un cardine per contenere il consumo di risorse finite e costose come il sangue umano ed i suoi derivati. Inoltre un uso appropriato può, a parità di efficacia clinica, ridurre i rischi della terapia trasfusionale per il paziente che, seppur diminuiti negli ultimi anni, non sono totalmente eliminabili. Per tali motivi è stato attivato uno studio sull'utilizzo clinico dei globuli rossi concentrati (GRC) nei reparti di Medicina della nostra Azienda Ospedaliera. Le richieste di sangue con indicazione clinica di anemia vengono valutate per il livello di Hb dichiarato dal medico richiedente: con  $Hb \leq 8$  gr/dL vengono per definizione considerate appropriate, con  $Hb \geq 10$  gr/dL inappropriate, con  $8 < Hb < 10$  gr/dL dubbie. In un secondo momento, le richieste dubbie vengono valutate considerando la diagnosi e i dati clinici riportati sulla richiesta, insieme ad altri parametri ematici disponibili, e sono riclassificate in appropriate o ancora dubbie. Infine, tutte le richieste inappropriate o riclassificate dubbie vengono discusse coi Referenti Trasfusionali delle Unità Operative coinvolte e si perviene ad una valutazione definitiva. Dal 1 luglio 2008 al 31 marzo 2009 sono state raccolte 502 richieste di trasfusioni di GRC per un totale di 1195 unità trasfuse. In base al valore di Hb le unità trasfuse sono state così classificate: 714 appropriate (59,8%), 446 dubbie (37,3%), 35 non appropriate (2,9%). In base ai dati clinici e alla diagnosi sono state valutate appropriate altre 336 unità di GRC. In sede di gruppo di lavoro sono state quindi discusse 73 richieste per un totale di 145 unità di GRC. La valutazione definitiva ha portato ad identificare altre 104 unità di GRC appropriate e dichiararne 41 inappropriate (3,4% del totale di 1195).

I dati preliminari ottenuti da questo periodo di valutazione ci sembrano molto confortanti e indicano quanto i medici dei nostri reparti di Medicina siano attenti nella gestione del paziente anemico. Peraltro, la presentazione di casi specifici durante le riunioni stimola una discussione attiva e coinvolgente, rivolta al miglioramento continuo.

#### Bibliografia

Raccomandazioni SIMTI sul corretto uso degli emocomponenti e dei plasmoderivati, Ed. SIMTI Servizi, 2008.

107

**LO SCREENING NEONATALE DELLE EMOGLOBINOPATIE SU SANGUE CORDONALE: DIAGNOSI CERTE O DA CONFERMARE?**

G. Ivaldi<sup>1</sup>, D. Leone<sup>1</sup>, D. Pascotto<sup>1</sup>, F. Moruzzi<sup>1</sup>, M. Mussap<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Genetica, Sez. Microcitemia, Osp. Galliera, Genova

<sup>2</sup>Lab. di Analisi Chimico Cliniche, A.O.U. S.Martino, Genova

Lo screening su sangue cordonale finalizzato alla ricerca di emoglobinopatie alla nascita è in uso in modo sistematico da oltre venti anni negli Stati Uniti per la ricerca dei portatori o degli affetti da Hb S. In Italia, in alcune particolari realtà come in Sardegna e in Liguria negli anni '80, si sono eseguiti screening su sangue di C.O. per valutare l'incidenza dell'alfa talassemia nella popolazione prevalentemente mediante dosaggio della quota di Hb Bart's presente. Non si sono mai eseguiti veri e propri screening neonatali sistematici in altre realtà importanti, come quella siciliana ad esempio, dove sappiamo essere particolarmente elevata la presenza di emoglobinopatie principalmente l'Hb S. Oggi l'esigenza di screening alla nascita nasce soprattutto in funzione della ricerca di emoglobinopatie sul sangue di funicolo destinato alla conservazione o proveniente dalle banche di cellule staminali ma in seguito ai recenti flussi migratori soprattutto i nati da genitori provenienti dall'Africa, dall'Albania e dall'Asia pongono nuovi quesiti diagnostici e suggeriscono screening neonatali mirati.

La possibilità di poter ottenere, esaminando il sangue prelevato dal cordone ombelicale, informazioni esaurienti ed utili per una diagnosi di emoglobinopatia è in gran parte subordinata ai metodi di indagine utilizzati. La regola generale degli screening è quella di utilizzare strumenti diagnostici atti a fornire risposte adeguate con un rapporto costo/beneficio ottimale: la cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) applicata a sistemi "dedicati" risponde a questa esigenza. L'esperienza di screening generalizzato tra il 1998 e il 2006 su oltre 3000 neonati e oggi di screening mirato in neonati selezionati per origine, familiarità e rischio ci consentono di definire con ragionevole certezza i limiti e le possibilità diagnostiche alla nascita:

- non è possibile diagnosticare con certezza la presenza della Beta Talassemia allo stato eterozigote mentre è possibile accertarne lo stato omozigote e la condizione di normalità;
- è possibile sospettare la presenza di alfa talassemia soprattutto nelle forme più marcate (presenza in quantità variabile di Hb Bart's).

108

**PRIMA OSSERVAZIONE IN UN SOGGETTO ITALIANO DI Hb G PEST: UNA RARA VARIANTE DELLE CATENE ALFA GLOBINICHE**

G. Barberio<sup>1</sup>, G. Ivaldi<sup>2</sup>, D. Leone<sup>2</sup>, D. Pascotto<sup>2</sup>, F. Moruzzi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. di Oderzo ULSS 9, Treviso

<sup>2</sup>Lab. di Genetica Sez. Microcitemia, Osp. Galliera, Genova

All'origine della maggior parte delle richieste di approfondimento sui difetti dell'emoglobina in età pediatrica vi è la necessità di una diagnosi differenziale in presenza di microcitosi. Una anemia microcitica non meglio definita recentemente osservata in un bambino di 3 anni con genitori entrambi veneti, ha portato il laboratorio di 1° livello ad esaminarne l'assetto emoglobinico avendo come sospetto diagnostico una sindrome talassemica. L'analisi in HPLC (Variant<sup>TM</sup> II  $\beta$  Thal.-Dual Kit-BioRad) metteva in evidenza la presenza di una Hb anomala pari al 12.4% (14.5% nella madre che risultata a sua volta portatrice dell'anomalia) e 14.1% con Variant<sup>TM</sup> II  $\beta$  Thal.-Short Program-BioRad). La variante era eluita, con entrambi i sistemi, ad un tempo del tutto sovrapponibile a quello caratteristico dell'Hb S, l'Hb A2 era normale-bassa, l'Hb F inferiore all'1%, un picco minore riferibile ad una "Hb A2 aggiuntiva" era giustificato dalla presenza della variante delle catene alfa globiniche. La caratterizzazione biochimico-funzionale nel propositus secondo le linee-guida internazionali ha infatti permesso di accertare la presenza di catene alfa mutate con una sostanziale stabilità dell'emoglobina "in vitro", il test di sickling era negativo, mentre i parametri emocromocitometrici risultavano significativamente alterati così come gli indici marziali. L'analisi molecolare specifica per la ricerca delle più frequenti alfa talassemie risultava negativa. L'analisi della sequenza nucleotidica dei geni alfa condotta nel laboratorio di riferimento ha mostrato sul 2° esone del gene alfa2 al codone 74 una transizione G>A riconducibile alla sostituzione aminoacidica Asp>Asn corrispondente all'Hb G Pest descritta trenta anni fa in una grande famiglia ungherese ma mai in soggetti italiani. L'osservazione casuale di questa variante ci ha permesso di: osservare una variante separata ad un tempo perfettamente coincidente con l'Hb S rendendo necessario il test di sickling per la conferma o l'esclusione; verificare che una variante delle catene alfa può presentarsi in quantità molto inferiore al 25% teorico anche se appartiene al gene alfa2 e anche in assenza di anemia, come dimostrato dal risultato della madre del propositus.

109

**FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF CIRCULANT MONOCLONAL PLASMA CELL IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED MULTIPLE MYELOMA AND MONOCLONAL GAMMOPATHIES OF UNCERTAIN SIGNIFICANCE (MGUS)**

F. Gervasi<sup>1</sup>, L. Carnevale<sup>1</sup>, S. Vlah<sup>1</sup>, C. Giambanco<sup>1</sup>, A. Ferraro<sup>1</sup>, G. Cardinale<sup>1</sup>, G. Pagnucco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Ematologia con T.M.O., Dip. Oncologia, P.O. M. Ascoli, ARNAS Civico, Palermo

The aim of this study was to quantify the number of circulating monoclonal plasmacells in the peripheral blood of patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) and in the monitoring of these patients and in patients with monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS). We think that circulating plasma cells (PCs) can be detected in the peripheral blood of a great proportion of patients with MM and with MGUS. The appearance of circulating PCs in the blood may be simply a reflection of a tumor mass, but it could also represent differences in the disease biology. We, in agreement with other groups, believe that the appearance of circulating PCs in the blood identifies relative independence from adhesion to the microenvironment and, in other words, signifies more aggressive disease. To these purposes we analyzed by flow cytometry peripheral blood samples from 10 patients without hematological disease, and from 15 patients with a diagnosis of de novo MM and from 20 patients with MGUS diagnosed on standard criteria, which were referred to our Division of hematology from march 2008 to march 2009.

Flow cytometry analysis was conducted with lyse no wash method. Data acquisition and analysis were performed with a Cyan ADP<sup>TM</sup> cytometer and Summit<sup>TM</sup> software (Beckman Coulter). Cells were stained with fluorescence-labelled CD38 FITC, CD56 PE, CD19 PerCp-Cy5.5, CD138APC, CD45 AMCyan, anti-k FITC and anti-λ PE antibodies (from BD Biosciences).

Circulating PCs were detected in all MM patients with the median PC count of 7 per 1.000.000 events. Circulating PCs were found in all patients; 5 MM patients had 1 to 10 circulating PCs. The remaining 15 patients had more than 10 circulating PCs. Circulating PCs were also detected in MGUS patients with the median PC count of 3 per 1.000.000 events. We didn't find any correlation between the degree of marrow involvement by PCs and the number of circulating PCs.

Our preliminary results show that PCs in peripheral blood represent differences in myeloma disease biology.

110

**Hb M IWATE: UNA RARA EMOGLOBINOPATIA ASSOCIATA A CIANOSI DIAGNOSTICATA IN UN BAMBINO COLOMBIANO**

G. Barberio<sup>1</sup>, G. Ivaldi<sup>2</sup>, D. Leone<sup>2</sup>, D. Pascotto<sup>2</sup>, F. Moruzzi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. di Oderzo ULSS 9, Treviso

<sup>2</sup>Lab. di Genetica Sez. Microcitemia, Osp. Galliera, Genova

Negli ultimi dieci anni un gran numero di varianti dell'emoglobina sono state osservate nei laboratori italiani soprattutto per l'aumentata presenza di soggetti immigrati da zone ad alta prevalenza di questi difetti e tra questi nuovi residenti dobbiamo anche comprendere i numerosi bambini adottati da genitori italiani. Recentemente un bambino di 10 anni adottato, di origine colombiana, è stato inviato per accertamenti di laboratorio, compresi gli esami di 1° livello per le emoglobinopatie, quando si è reso più manifesto un colorito cianotico soprattutto alle labbra; in precedenza tale caratteristica era stata giustificata facendola rientrare tra i tratti somatici dei Sud americani. L'analisi in HPLC (Variant<sup>TM</sup> II β Thal.-Dual Kit-BioRad) metteva in evidenza la presenza di una Hb anomala pari al 14.8% (17.8 % con Variant<sup>TM</sup> II β Thal.-Short Program-BioRad) l'Hb A2 leggermente sovrastimata e l'Hb F inferiore a 1%. I parametri emocromocitometrici erano nella norma, non anemia e i test per la stabilità "in vitro" negativi. L'analisi della sequenza nucleotidica dei geni alfa e beta globinici eseguita nel laboratorio di riferimento ha mostrato sul 2° esone del gene alfa2 al codone 87 una transizione C>T riconducibile alla sostituzione aminoacidica His>Tyr corrispondente alla variante Hb M-Iwate nota dal 1960 per essere stata osservata in una famiglia giapponese e successivamente in diverse etnie; anche in Italia è stata descritta nel 1981, ad oggi però non risulta essere mai stata osservata i soggetti ispanico-americani. La famiglia delle "emoglobinosi M" è particolarmente interessante in quanto le varianti nelle quali uno dei residui di His a contatto dell'eme è sostituito da Tyr subiscono una veloce auto-ossidazione provocando cianosi congenita o metaemoglobinemia.

Dall'osservazione di questo caso possiamo concludere che:

- in mancanza di una storia familiare per emoglobinopatie risulta importante poter indagare in modo approfondito sulla natura di certi difetti per poter correlare utilmente i fenotipi rilevati con il genotipo causale.

111

**VALUTAZIONE CITOFLUORIMETRICA CON SINGLE-TUBE DI DISORDINI NON EMATOLOGICI**

A. Di Palma<sup>1</sup>, D. Avino<sup>1</sup>, G. Odierna<sup>1</sup>, A. Sabatino<sup>1</sup>, B. Talento<sup>1</sup>, C. Esposito<sup>1</sup>, P. Danise<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*U.O. Diagnostica Ematologica, Dip. di Onco-Ematologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore, Salerno*

**Introduzione.** Nella routine emocitometrica sono frequenti anomalie qualitative e quantitative non sempre riconducibili a malattie ematologiche, che richiedono approfondimento con dispendio di energie. E' stata valutata la possibilità di distinguere in via preliminare, con un test citofluorimetrico automatizzato, campioni con disordini ematologici da approfondire con citofluorimetria tradizionale e campioni con anomalie leucocitarie di altra origine.

**Materiali e Metodi.** Sono stati esaminati 209 campioni: 98 con disordini ematologici diagnosticati secondo i correnti criteri (16 leucemie acute, 42 malattie linfoproliferative, 4 leucemie mieloidi croniche, 36 sindromi mielodisplastiche) e 101 con disordini leucocitari di altra origine (22 linfocitosi, 16 neutrofilie, 36 monocitosi, 27 leucopenie). I campioni sono stati processati con analizzatore Coulter LH 780, sistema gestionale Modulab e citofluorimetro Coulter FC 500 in grado di identificare 16 sottopopolazioni leucocitarie con un single tube a 6 anticorpi monoclonali/5 colori: CD36-FITC/CD2-PE/CRTH2-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy7. I campioni sono stati valutati mediante citofluorimetria tradizionale e revisionati al microscopio secondo protocollo NCCLS H20A.

**Risultati - Conclusioni.** In tutte le leucemie acute è stata identificata la popolazione blastica con gli anticorpi CD45/CD16/CD19. Tutte le malattie linfoproliferative B sono state evidenziate con CD19/CD2, tutte le leucemie mieloidi croniche con CD45/CD16. La combinazione di SS e CD16 ha permesso di evidenziare tutte le Sindromi Mielodisplastiche ad eccezione di due 5q- prive di anomalie leucocitarie. I disordini leucocitari di altra origine sono stati correttamente separati in quanto presentanti patterns citofluorimetrici diversi da quelli delle patologie oncoematologiche sopra elencate, con un corretto orientamento di linea di maturazione e attivazione fornito dalle combinazioni di anticorpi.

L'uso del single tube si è rivelato utile nella routine per indirizzare correttamente i campioni con patologie oncoematologiche verso la citofluorimetria classica, limitando nel contempo il ricorso a questa procedura.

**Bibliografia**

Faucher et al. "6 markers/5colors extended white blood cell differential by flow cytometry CytometryA 2007 nov;71(11):934-44.

112

**MONOCLONAL LAMBDA FREE LIGHT CHAINS: BIOCHEMICAL BEHAVIOUR AND PATHOGENETIC CLASSIFICATION**

A. Dossi<sup>2</sup>, E. Alghisi<sup>1</sup>, L. Econimo<sup>3</sup>, L. Paolini<sup>1</sup>, L. Caimi<sup>1</sup>, A. Radeghieri<sup>1</sup>, G. Cancarini<sup>3</sup>, D. Ricotta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Brescia*

<sup>2</sup>*Lab. Analisi Chimico Cliniche, Azienda Osp. Spedali Civili di Brescia*

<sup>3</sup>*Div. e Cattedra di Nefrologia, Azienda Osp. Spedali Civili di Brescia*

Monoclonal Free Light Chains (FLC) are present in the serum and urine of many patients with plasma cell proliferation diseases. These paraproteins, despite of having a similar structure, present different nephrotoxicity patterns probably due to their physical-chemical characteristics. In the present study we tried to identify a correlation between the FLC phenotype and their pathogenicity analysing the FLC interaction with different cellular and synthetic membranes. We tested serum and urine of some patients hospitalized for acute renal failure and selected those presenting monoclonal lambda FLC. The serum and urine samples were processed for standardized diagnostic tests such as: serum protein electrophoresis, immunofixation and FLCs quantification. Furthermore to analyse the different lambda FLC tropism for cellular membranes we established internalization experiments(1) with different cellular lines deriving from cervix uterin epithelia, endothelium, kidney epithelial tissue and fibroblastoid cells. Moreover we performed an aggregation assay by the easy way of Dot Blot experiments on nitrocellulose membrane. Our results highlight that the monoclonal FLC of all patients have a higher affinity for endothelial and epithelial membranes instead of fibroblastoid and kidney epithelia. In addition the FLC of each patient show a different affinity for the same cellular line. Analysing these data we could hypothesize that the lambda FLC adhesion in different peripheral districts depends on high specific receptors expressed on certain cellular lines and/or that each patient has an individual clinical pattern due to the paraproteins molecular structure. In future it will be necessary to test a larger group of patients for more detailed information. These data, supported by the clinical history and classical diagnostic tools, could allow to classify more precisely the pathological serum Free Light Chains.

**Reference**

1. Butch AW, Kelly KA, Munshi NC. Dendritic cells derived from multiple myeloma patients efficiently internalize different classes of myeloma protein. *Exp Hematol* 2001 Jan;29(1):85-92.

113

### NUMERO DI CELLULE CD34+ CIRCOLANTI NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE

F.M. Biella<sup>1</sup>, C. Parma<sup>1</sup>, A. Cappellani<sup>1</sup>, B. Cremonesi<sup>1</sup>, F. Sciarini<sup>1</sup>, G. Limonta<sup>1</sup>, P. Tramacere<sup>1</sup>, P. Mocarrelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio

Introduzione. Le sindromi mieloproliferative croniche (SMP) sono malattie neoplastiche caratterizzate dall'espansione clonale di uno o più progenitori ematopoietici in sede midollare o extramidollare. Esse comprendono la leucemia mieloide cronica (LMC), contraddistinta da un'alterazione citogenetica e molecolare caratteristica (cromosoma Philadelphia e gene di fusione BCR-ABL), la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE) e la mielofibrosi idiopatica (MI). Ciascuna di queste forme può trasformarsi in mielofibrosi o leucemia mieloide acuta. In letteratura è stata evidenziata l'utilità della conta assoluta di cellule CD34+ circolanti nella diagnosi differenziale delle SMP Philadelphia negative (Ph-). In particolare, una conta pari o superiore a  $15 \times 10^6/L$  consente di distinguere la MI, da PV e TE. Scopo di questo lavoro è quello di valutare la rilevanza clinica di tale test diagnostico nella nostra casistica.

Materiali e Metodi. Sono stati arruolati nello studio 46 pazienti con diagnosi di MPD Ph- (di cui 8 PV, 25 TE e 13 MI, fra cui 8 primitive e 5 evolute da PV o TE) e sottoposti alla conta di CD34+ al momento della diagnosi o durante il decorso della malattia. Il test è stato eseguito mediante analisi citofluorimetrica con Stem Kit Reagents su Epics XL-MCL (Instrumentation Laboratories). La diagnosi è stata formulata integrando i dati clinici e di laboratorio secondo le indicazioni fornite dalle linee guida.

Risultati. La conta assoluta media di CD34+ nel gruppo di 13 pazienti con MI ( $38,1 \times 10^6/L$ ) è significativamente superiore ( $p < 0.001$ ) rispetto a quella osservata nel gruppo di 33 pazienti senza MI ( $3,4 \times 10^6/L$ ). Il test è risultato positivo ( $CD34+ \geq 15 \times 10^6/L$ ) in 10 pazienti con MI e in 1 paziente senza MI, mentre è risultato negativo in 32 casi senza MI e in 3 casi con MI. Quindi le prestazioni del test sono le seguenti: sensibilità del 77%, specificità del 97%, valore predittivo positivo del 91% e negativo del 92%.

Conclusioni. Nella nostra popolazione il numero di cellule CD34+ circolanti consente di distinguere la MI dalle altre SMP Ph-. Tale determinazione risulta utile sia per la diagnosi differenziale che per monitorare un'eventuale evoluzione.

#### Bibliografia

Passamonti F. Haematologica 2003;88:1123-29.

114

### MODULATION OF REDOX BALANCE AND ACTIVATION OF ANTI-APOPTOTIC PATHWAYS, REVEALED BY COMPARATIVE PROTEOMICS, ARE ASSOCIATED TO IMATINIB RESISTANCE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

I. Colavita<sup>1</sup>, N. Esposito<sup>1</sup>, R. Martinelli<sup>1</sup>, J.V. Melo<sup>2</sup>, F. Pane<sup>1</sup>, M. Ruoppolo<sup>1</sup>, F. Salvatore<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate S.c.a.r.l., Napoli and Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Napoli

<sup>2</sup>Division of Haematology, Institute of Medical & Veterinary Science, Adelaide SA

The molecular hallmark of chronic myeloid leukemia (CML) is the Philadelphia chromosome (Ph) which results from a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22. Philadelphia chromosome contains a BCR-ABL hybrid gene that encodes an oncogenic fusion protein. The Bcr-Abl protein has a deregulated tyrosine kinase activity that promotes cell growth through phosphorylation of signalling proteins (1). Imatinib-mesylate, a potent inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase, is used as front-line therapy in CML. The aim of our study was to obtain insights into the mechanisms underlying imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. As experimental model, we used the imatinib-resistant KCL22R and sensitive KCL22S cells. Because none of the known resistance mechanisms has been detected in these cell lines, novel mechanisms could be envisaged. We characterized proteins that were differentially expressed in KCL22S and KCL22R cells using a proteomic approach (2D-DIGE, two-dimensional differential gel electrophoresis coupled with Tandem Mass Spectrometry). We identified 50 proteins: 27 were over-expressed and 23 under-expressed in KCL22R cells versus KCL22S cells. Several of these proteins were involved in two processes that could explain imatinib resistance: modulation of mechanisms underlying redox balance, and activation of anti-apoptotic pathways mediated by NF- $\kappa$ B and Ras-MAPK signaling. The latter process involves several heat shock proteins that were differentially expressed between chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib and responder patients.

#### Reference

1. Goldman JM, Melo JV. Acta Haematol 2008;119(4):212-7.

115

**DIAGNOSTICS OF THYROID'S PATHOLOGIES TO BRINDISI TERRITORY'S POPULATION AND EXPERIMENTAL MODEL OF NEURAL NET'S TRAINING TO DEFINE REFERENCE VALUES AND CONNECTED PATHOLOGIES**

M. Scoditti<sup>1</sup>, A. Sanasi<sup>1</sup>, R. Incalza<sup>1</sup>, S. Lofino<sup>1</sup>, T. Voi<sup>1</sup>, P. Palamà<sup>2</sup>, G. Richelini<sup>2</sup>, F. Bianco<sup>3</sup>, G. D'Adamo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica Territoriale e Tossicologia "A. Di Summa", Brindisi

<sup>2</sup>I.L.S. s.r.l. Brindisi

<sup>3</sup>LIBET s.r.l. Brindisi

<sup>4</sup>SOREP s.r.l. Porto Cesareo

The majority thyroid's pathologies can be caused by excessive or reduced production of thyroid's hormones. For this reason the measure of hormones FT3, FT4 and TSH is very important and it can be taken by some tests in laboratory. The project was realized to evaluate normal concentration's range of these hormones and fit them to value ASL of Brindisi's patients. Moreover this project is aimed to diagnose thyroid's pathologies and to help general practitioner to let the patients hold inquiries on these illnesses. Data about FT3, FT4 and TSH 'S tests of the last 2 years have been extracted from central database. Among 900 models the possible pathologies had been identified, from the most to the less possible. Then we proceeded to validity of parameters' values really measured on 1217 patients. If similarity data are the same as the clinician data, the verdict is ok, or else it is ko. This procedure's efficacy is proved by similarities between models and patients which are larger than non-similarities. Then we elaborated some comparison of models and patients graphic and this treatment allows to grant new FT3 (2,4- 3,9 pg/ml), FT4 (0,5 - 1,5 ng/dl) and TSH (0,4 - 3,6 mU/l) values. We are allowed to change hormones' ranges according to our results, after a careful statistic evaluation. Besides neural net's training lets us associate a possible illness to out range values. It must be considered that every neuron could represent a possible pathology according to a very variable percentage.

**References**

1. Lenti L, Lococo E, Mardente S, et al. Caratterizzazione fenotipica e funzionale dei linfociti nella tiroidite di Hashimoto, Società italiana di Patologia, 26° Congresso nazionale Catania, 29 settembre-02 ottobre 2002.
2. Kohonen T, 1998. "Self-organizing and Associative Memory" 3rd edition, Springer-Verlag. Berlino, 2000.

116

**VALUTAZIONE DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO (MBRO) IN DONNE SOTTOPOSTE A PROCEDURA DI STIMOLO PER FECONDAZIONE IN VITRO**

G. Bonetti<sup>1</sup>, F. Stefani<sup>1</sup>, G. Bugari<sup>2</sup>, G. Mazziotti<sup>3</sup>, T. Porcelli<sup>3</sup>, G. Donarini<sup>4</sup>, V. Guella<sup>4</sup>, A. Giustina<sup>3</sup>, U. Omodei<sup>4</sup>, F. Pagani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili di Brescia

<sup>2</sup>3°Lab. di Analisi, A.O. Spedali Civili di Brescia

<sup>3</sup>Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Brescia

<sup>4</sup>Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università di Brescia

Scopo. Valutare il ruolo di estrogeni e di FSH sul metabolismo osseo mediante l'impiego dei MBRO in un modello clinico di pazienti sottoposte a procedura di stimolo per fecondazione in vitro.

Materiali e Metodi. In 29 donne infertili a diverse fasi della procedura (P0 basale, P1 12°-20° giorno (g) dall'inizio della soppressione ovarica con enantone, P2 3°g di stimolazione con gonadotropine (Gn), P3 10°g di somministrazione di Gn, P4 g pick-up, P5 g transfer) sono stati determinati su siero 17βestradiolo (E2), FSH, osteocalcina (OC, µg/L) (m. formazione) e telopeptide carbossi-terminale del collagene tipo I (β-CTX, µg/L) (m. riassorbimento).

RIS. P0: OC 18±5, β-CTX 0.274±0.160. P1: OC 14±4, β-CTX 0.355±0.139. P2: OC 15±4, β-CTX 0.327±0.184. P3: OC 15±5, β-CTX 0.282±0.133. P4: OC 17±4, β-CTX 0.303±0.163. P5: OC 9±5, β-CTX 0.207±0.117. I valori degli ormoni ai vari punti hanno evidenziato variazioni coerenti con quanto ipotizzato nel disegno dello studio, essendo conseguenti al trattamento farmacologico a cui le pazienti erano sottoposte.

Discussione. L'attivazione del riassorbimento e la riduzione della neoformazione osservati al P1 sono giustificabili dal crollo di E2. La normalizzazione di β-CTX mentre permane ridotta la OC al P2, mostrano un ruolo di E2 nel riassorbimento e un effetto inibitorio di FSH sulla neoformazione, ipotesi confermata dalla situazione metabolica a P3. In P5, con valori di E2 ancora elevati associati a bassi livelli di FSH, si assiste ad una ulteriore riduzione di β-CTX e ad una riduzione di OC. Una possibile spiegazione dell'andamento dei marcatori ossei potrebbe essere quella dell'instaurarsi in questa fase di una marcata iperestrogenemia, dovuta alla produzione endogena in associazione alla somministrazione dello stesso ormone, oppure ad un effetto a lungo termine dell'iperestrogenismo sul riassorbimento con conseguente blocco della neoformazione. Conclusioni. E2 mostra possedere un'importante azione sul metabolismo osseo, in particolare verso il riassorbimento. Le modificazioni della neoformazione potrebbero essere conseguenza compensativa dell'effetto estrogeno-indotto sul riassorbimento, ma potrebbero anche spiegarsi con un effetto diretto di FSH sugli osteoblasti.

117

### INCIDENZA DELLE ISOFORME MACROMOLECOLARI DELLA PROLATTINA IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRATTAMENTI CON FARMACI ANTIPSICOTICI ATIPICI

V. Marrè<sup>1</sup>, G. Devoto<sup>1</sup>, S. Massaro<sup>1</sup>, R. Tronci<sup>1</sup>, P. Botto<sup>1</sup>, D. Pietropaoli<sup>2</sup>, E. Flacco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Ospedale di Lavagna, Genova

<sup>2</sup>U.O. Psichiatria, Ospedale di Lavagna, Genova

Scopo del presente lavoro è quello di valutare l'incidenza delle isoforme macromolecolari di prolattina in corso di terapia con farmaci antipsicotici. Abbiamo arruolato 62 Pazienti, 32 Maschi e 30 Femmine, di età media  $24 \pm 12$  aa, trattati con farmaci antipsicotici atipici. Abbiamo dosato la prolattina sierica, con metodo Prolactin II in elettrochemiluminescenza su analizzatore Modular Analytics E170 (Roche). Per valutare la presenza delle isoforme macromolecolari abbiamo dosato la prolattina sul surnatante ottenuto dopo trattamento con PEG 6000, definendo macroprolattinemi i sieri con percentuale di recupero inferiore a 40. Abbiamo registrato 40 Pazienti con iperprolattinemia. I trattamenti con Risperidone e Paliperidone si associavano invariabilmente a iperprolattinemia. Tale dato era presente in percentuali significativamente più basse nei pazienti sottoposti a trattamenti con altri farmaci antipsicotici atipici. In nessuno dei campioni con iperprolattinemia abbiamo evidenziato la presenza di isoforme macromolecolari dell'ormone. Il nostro lavoro conferma i dati della letteratura che evidenziano un incremento delle concentrazioni sieriche della prolattina durante la terapia con farmaci antipsicotici. La metodica Prolactin II dimostra sia una bassa sensibilità alle isoforme macromolecolari della prolattina che consente di evitare la precipitazione con PEG 6000 permettendo un'ottimizzazione dei costi, dei tempi di refertazione sia una significativa correlazione con i quadri clinici. L'utilizzo di una metodica low reader alle forme macromolecolari permette in questi pazienti di ottimizzare la terapia evidenziando le vere iperprolattinemie, le sole cioè che possono giustificare uno switch terapeutico che se inappropriato può avere delle conseguenze negative sulla stabilizzazione del quadro clinico in pazienti fragili. Traslando i risultati ottenuti nella routine quotidiana l'utilizzo di un metodo low reader permette di evitare errori diagnostici e trattamenti terapeutici inappropriati.

118

### DETERMINATION OF INHIBIN A POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AND ENDOMETRIOSIS

C. Cosma<sup>1</sup>, C. Fiore<sup>2</sup>, D. Armanini<sup>2</sup>, D. Faggian<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Laboratory Medicine, University of Padua, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Medical Surgical - U.O. Endocrinology, University of Padua, Italy

Background. The variation of serum concentration of inhibin A in polycystic ovary syndrome (PCOS) and endometriosis has been monitored.

Methods. 30 women, 15 with PCOS and 15 reference subjects, as a control group, matched for age and BMI, has been studied. Criteria for inclusion are clinical signs of hyperandrogenism, oligomenorrhea and polycystic ovaries being excluded other diseases. The serum concentration of inhibin A was determined at 7, 14, 21 days of the menstrual cycle. People recruited for endometriosis study consists of a group of 30 women, 15 reference subjects and 15 suffering from endometriosis. People suffering from endometriosis were subjected to venous sampling during the surgery and 1 month after. Inhibin A was measured using automatic immunoassay method (Access, Beckman Coulter).

The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Results. Inhibin A concentration shows dynamic release in the three phases of the menstrual cycle, decreasing in PCOS women, especially at 14th day; the mean value in controls ( $43.78 \pm 31,12$ ) pg/ml is significantly higher than in patients with PCOS ( $26,6 \pm 21,81$ ) pg/ml.

In endometriosis, mean value of inhibin A 1 month after the surgery is significantly decreased in comparison to the mean baseline ( $12,0 \pm 7,7$  vs  $24,65 \pm 17,9$ ) pg/ml.

Conclusion. This study showed that the values of inhibin A in patients with PCOS are lower at 14th day in comparison to reference subjects, suggesting that, in endometriosis, inhibin A determination could be useful in post-surgery monitoring.

119

### IMPROVEMENT OF AN LC-MS/MS METHOD FOR QUANTITATIVE SALIVARY CORTISOL DETERMINATION: TECHNICAL AND OPERATIVE CONSIDERATIONS

S. Persichilli<sup>1</sup>, F. Iavarone<sup>1</sup>, J. Gervasoni<sup>1</sup>, C. Carrozza<sup>1</sup>, F. Bonelli<sup>2</sup>, C. Zuppi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>IRBM, Ist. di Ricerche di Biologia Molecolare, Pomezia, Roma

**Background.** Cortisol concentration in biological samples, such as serum urine and saliva, has been used as biomarkers for adrenal pathologies. However, the sampling of blood may induce emotive reactions that may modify the results and the 24 hrs urine collection is a time consuming procedure not always correctly performed. However, salivary cortisol can be collected easily in a stress-free manner and it strongly correlates with plasma cortisol, thus nightly salivary cortisol has been suggested as diagnostic test for Cushing Syndrome. Since cortisol levels in saliva are about two orders of magnitude lower than those in serum and urine (1–8 ng/mL in the morning and 0.1–1 ng/mL in the evening), it is necessary to develop a simple, sensitive, and accurate method for its determination.

In this work we report the improvement of a method for determination of cortisol levels in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry.

**Methods.** Saliva from 20 volunteers and from 5 patients with Cushing Syndrome were collected at 23 p.m. using the Salivette tubes. Cortisol was determined by LC-MS/MS using a TSQ QUANTUM ULTRA triple quadrupole tandem mass spectrometer operating with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) in the positive mode. Cortisol was analyzed in Highly Selective Reaction Monitoring following the transitions related to precursor 363.2 for cortisol and 367.2 for deuterated cortisol. All the transitions were acquired at resolution of 0.25 amu FWHM (Full Width Half Maximum).

Saliva samples containing 10 ng/ml of internal standard (cortisol-d4) were deproteinized using 10K NanoSep centrifugal filters and injected on a reversed phase column. Method validation included precision, linearity, sensitivity recovery and selectivity.

**Results and Conclusions.** The method is linear in the range 0.2-10 ng/mL; limit of detection is 0.1 ng/mL. Total imprecision is lower than 10% and recovery was higher than 90%. The reference limit for salivary cortisol in healthy subjects was 1.1 ng/mL. Moreover all patients with Cushing Syndrome show salivary cortisol concentration higher than 1.5 ng/ml. This methods exhibits a specificity and sensitivity adequate for salivary cortisol determination and may be useful for Cushing Syndrome diagnosis.

120

### P27(KIP1) POLYMORPHISMS IN MEDULLARY THYROID CARCINOMA: A NEW PROGNOSTIC FACTOR

L. Circelli<sup>1</sup>, A. Faggiano<sup>2</sup>, A. Renzullo<sup>3</sup>, G. Accardo<sup>3</sup>, V.R. Coppola<sup>3</sup>, A. Colao<sup>2</sup>, A. Bellastella<sup>3</sup>, D. Pasquali<sup>3</sup>, V. Colantuoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Dip. di Scienze Biologiche ed Ambientali Università degli Studi del Sannio, Benevento

<sup>2</sup>Dip. di Endocrinologia ed Oncologia Molecolare e Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>3</sup>Dip. di Medico-Chirurgico di Internistica Clinica e Sperimentale "F. Magrassi e A. Lanzara", Seconda Università di Napoli, Napoli

CDKN1B encodes for the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27 (Kip1), an important cell-cycle regulator that controls the cell cycle progression from G1 to the S phase. It interacts with cyclinE/Cdk2 and cyclinD1/Cdk4 complexes, stimulating their degradation or inhibition. Loss of p27 function may contribute to tumorigenesis. A total of 21 single nucleotide polymorphisms in CDKN1B have been described, eleven of which have low allelic frequency (5%) and nine occur within the noncoding regions of the gene. One single nucleotide polymorphism (T/G) causes a glycine to valine substitution at codon 109, that affects p27 degradation in vivo and appears to be associated with advanced prostate, breast and oral cancers, suggesting a role in tumor progression. Furthermore, expanded pedigree analysis showed that p27 mutations are associated with the development of a MEN-like phenotype (MENX) (1). We evaluated the frequency of the CDKN1B V109G polymorphism in sporadic medullary thyroid carcinomas (MTC) tested negative for RET mutations in order to correlate these tumors with disease progression and outcome. We examined the V109G variant on germline DNA from forty-two patients affected by sporadic MTCs, using PCR amplification of p27 exon 1, followed by direct sequencing of the amplicon. 47% of the samples analyzed were positive for the polymorphism, a significantly higher frequency than that reported (20%) in other neoplasias and that found in the control population (circa 30%, n=41). Interestingly, the polymorphism was associated with a better prognosis, absence of recurrences and/or metastatic spreading as compared to wild type sequence bearing patients. These data suggest that p27 V109G polymorphism may play a critical role in the aggressiveness of MTCs not addressed so far. Moreover, its detection may be used as a prognostic factor, especially if associated with other markers of cell proliferation.

Reference

1. Pellegata NS et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. PNAS 2006;103:1558-563.

121

**MARKERS ORMONALI NELLA VALUTAZIONE DELLA RISERVA OVARICA**C. Carrozza<sup>1</sup>, R. Apa<sup>2</sup>, S. Paoletti<sup>2</sup>, M. Pennacchioli<sup>2</sup>, C. Zuppi<sup>1</sup><sup>1</sup>Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma<sup>2</sup>Ist. di Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

La misurazione dei livelli basali di FSH day 3 rappresenta il marker ormonale più utilizzato nella pratica clinica come test di screening nei protocolli di infertilità. Limiti del dosaggio dell'FSH includono la mancanza di un univoco valore di cut-off e la variabilità interciclica nella stessa donna. L'AMH è una glicoproteina appartenente alla superfamiglia del transforming-growth-factor- $\beta$ . E' espresso nelle cellule della granulosa dei follicoli in crescita raggiungendo elevati livelli di espressione sui follicoli pre-antrali e antrali (2-6 mm). L'AMH non presenta fluttuazioni durante il ciclo mestruale ed è considerato un indice sensibile di attività ovarica.

Scopo dello studio è confrontare l'efficacia analitica e clinica di FSH e AMH come markers ormonali nella valutazione della riserva ovarica. Sono state studiate 50 pazienti infertili (età<43aa), normovulatorie afferenti al DH di ginecologia disfunzionale del nostro policlinico per essere sottoposte a terapia di induzione dell'ovulazione. E' stato effettuato prelievo ematico per AMH e FSH in fase follicolare precoce (terza giornata) e conta dei follicoli antrali (ACF) mediante valutazione ultrasonografica. Il dosaggio dell'AMH è stato effettuato in duplicato con metodo ELISA Immunotech, Beckman Coulter (sensibilità analitica 0.40 ng/ml). L'FSH è stato dosato con metodo ECLIA Roche su analizzatore Modular E (sensibilità analitica 0.10 mIU/mL). I CV intra e interassay sono risultati <10% per i due metodi.

L'analisi dei dati mostra come la AFC correli in maniera significativa con i livelli di AMH ( $p=0.001$ ) e inversamente con l'età ( $p=0.01$ ). Non è emersa al contrario una correlazione significativa tra AFC e FSH 3 day ( $p=0.1$ ). E' stata inoltre correlata la risposta follicolare in termini di numero di follicoli periovulatori con i suddetti parametri risultando una correlazione significativa e diretta con AMH ( $p=0.002$ ) e AFC ( $P=0.000$ ) e inversa con l'età ( $p=0.01$ ). Nessuna correlazione significativa con l'FSH.

Dallo studio emerge che l'AMH è un efficace marker nella valutazione della riserva ovarica e l'associazione combinata dei due parametri AMH-AFC, permette insieme all'età di predire la risposta follicolare alla stimolazione ovarica controllata.

122

**DOTTO ARTERIOSO PREVIO IN NEONATI PRETERMINE: TERAPIA CON IBUPROFENE E REALIZZAZIONE DI UN METODO OTTIMALE IN HPLC PER IL SUO MONITORAGGIO TERAPEUTICO**R. Ciuti<sup>1</sup>, S. Cappellini<sup>1</sup>, A. Michahelles<sup>1</sup>, C. Dani<sup>2</sup><sup>1</sup>Centro di Riferimento Regionale per il dosaggio di farmaci e droghe d'abuso su liquidi biologici, AOU Careggi, Firenze<sup>2</sup>D.A.I. Neonatologia, AOU Careggi, Firenze

L'impiego di ibuprofene costituisce l'approccio farmacologico d'elezione per il trattamento del dotto arterioso pervio (PDA), una cardiopatia congenita caratterizzata dal non chiusura del dotto "forame di Botallo", avente nei neonati pretermine incidenza assai elevata (fino al 40%), inversamente proporzionale a età gestazionale e peso. Scopo del lavoro è stato quello di allestire un metodo valido e accurato per la determinazione dell'ibuprofene nel siero del neonato. L'ibuprofene, categoria dei FANS, è il farmaco d'elezione per il trattamento del PDA; il meccanismo su cui si basa è la riduzione delle prostaglandine (E2) per inibizione delle COX e quindi inattivazione dell'ac.arachidonico alla formazione delle stesse. Diagnosi precoce e terapia d'urgenza sono rese necessarie dalla gravità delle conseguenze cliniche: sovraccarico di volume del ventricolo sx, aumento della pressione atriale sx, insuff. mitralica, scompenso cardiaco.

Materiale e Metodi. Sono stati selezionati 2 gruppi "random" di neonati pretermine (< 28 sett). Al primo gruppo (G1) è stata somministrata una dose bassa di ibuprofene (10 mg/Kg di PEDEA<sup>®</sup>), al secondo (G2) una dose doppia. Il rationale è stato verificare se la dose "bassa" era sufficiente alla chiusura del dotto, valutando nel siero del neonato la concentrazione del farmaco dopo 15 minuti dall'assunzione e dopo 24 h. I dosaggi sono stati eseguiti in HPLC (Agilent-Biorad) con metodica da noi ottimizzata e validata consistente in colonna C18, estrazione liq/liq con esano/isopropanolo 1:1,f.m. 60% Acetonitrile in tampone fosfato pH=4.9,#=210 nm, standard interno: Clobazam, T:30°C,run: 10'. Precisione: CV=3.5%, LOQ=0.42 mg/l, recupero 96%.

Risultati. La media dei valori (DS) del G1 dopo 15' e 24h=27.8mg/l (15) e 19.4mg/l (11). Del G2=59 mg/l(20) e 31.7mg/l(8). Su uno dei 9 neonati trattati con basso dosaggio il trattamento non ha avuto effetto e la concentrazione verificata nel siero era solo di 1.6 mg/l.

Conclusioni. Dalla nostra esperienza risulta che anche un dosaggio basso di ibuprofene è sufficiente a trattare con successo il PDA, ma è indispensabile controllare la concentrazione del farmaco nel siero del neonato.

**Bibliografia**

Save TK, HPLC determination of ibuprofen in plasma; J Chrom B Biomed Sci Appl 1997;690:315-9.

123

**LA DETERMINAZIONE DELLA CDT% IN DUE DIFFERENTI POPOLAZIONI DELLA ASL DI BRESCIA**

E. Grassi<sup>1</sup>, F. Speziani<sup>1</sup>, L. Consolati<sup>1</sup>, R. Patelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Sanità Pubblica, Brescia

Il problema alcol è di grande rilevanza non solo medica, ma anche sociale ed economica. E' quindi prioritario sviluppare strategie efficaci per prevenirlo, diagnosticarlo, trattarlo.

Nell'ambito della diagnosi di abuso alcolico è ormai accettato dalla comunità scientifica l'utilizzo della CDT% quale marcatore biochimico più specifico rispetto ad altri.

Al Laboratorio di Sanità Pubblica della ASL di Brescia vengono analizzati campioni di soggetti in trattamento per abuso cronico di alcol provenienti dal NOA e dai SerT di Brescia e campioni di soggetti inviati dalla Comm. Locale Patenti di Guida a seguito di ritiro della patente per art.186 del codice della strada.

Lo scopo del presente lavoro è analizzare i dati provenienti dalle due popolazioni definirne la % di positività, la media e il range; verificare la prevalenza delle varianti genetiche nella popolazione.

Materiali e Metodi. Campioni: 1319 dei servizi di alcol-tossicodipendenza di Brescia e 67 di soggetti sottoposti a esame alcolemico in ottemperanza ai controlli relativi all'art. 186.

A 150 ul di siero si aggiungono 450 ul di un pool di reagenti con funzione di precipitare le lipoproteine e saturare il ferro (Bio-Rad). Dopo incubazione di 30 min ed opportuna centrifugazione, 400 ul di sovrantante vengono analizzati con sistema VARIANT HPLC (Bio-Rad).

Il cut-off di positività adottato espresso come % di CDT rispetto alla transferrina totale è pari a 2%, come suggerito dalla letteratura internazionale.

Risultati. 10.8% di campioni positivi dei soggetti in terapia (media=3,5; range=2-11.7) 5.9% di campioni positivi dei soggetti sottoposti a revisione della patente (media=2,32; range=2-3.1).

Le varianti genetiche 4 (904 soggetti analizzati) pari a 0,66%; di esse non si è proceduto all'identificazione del tipo di variante nè al calcolo della percentuale, ma ci si è limitati alla sola indicazione qualitativa di presenza di variante

Conclusioni. Se usato in modo appropriato e in associazione ad altri la CDT% risulta essere un test in grado di migliorare le conoscenze sull'abitudine all'alcol e rappresenta una metodologia di valutazione oggettiva del trattamento disintossicante.

**Bibliografia**

Bernini M, Ruffini D. Studio delle varianti genetiche della transferrina nella popolazione bresciana con un metodo HPLC.

124

**DOSAGGIO ALCOL: UN PERCORSO TRA PROBLEMI CLINICI E FORENSI**

M. Brugia<sup>1</sup>, F. Balducci<sup>1</sup>, A. Serpilli<sup>1</sup>, V. Scocco<sup>1</sup>, M. Tocchini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Biochimica Clinica e Microbiologa, Ospedali Runiti, Ancona

Il consumo di alcol, oltre che costituire un problema sociale e clinico di grande rilevanza, ha richiesto nel tempo anche un crescente impegno da parte del Laboratorio di Analisi di Biochimica Clinica a cui vengono inviati campioni biologici per vari scopi: accertare l'avvenuta assunzione di etanolo per motivi clinici e/o in seguito ad incidenti stradali.

All'inizio del 2008 un gruppo di lavoro interdisciplinare aziendale ha elaborato un protocollo per gestire le problematiche annesse a pazienti afferenti al Pronto Soccorso coinvolti in incidenti stradali.

Scopo del lavoro è la valutazione statistica dell'incidenza dell'abuso di alcol sia nei soggetti giunti all'osservazione del Pronto Soccorso per sospetta intossicazione acuta (scopo clinico) che nei conducenti degli autoveicoli (scopo forense) coinvolti in incidenti stradali.

Nel periodo compreso tra 1/1/2008 e 30/4/2009 sono stati richiesti al nostro Servizio 1210 dosaggi per problemi di intossicazione acuta e 696 dosaggi di alcol etilico su richiesta delle Forze dell'Ordine.

Materiali e Metodi. I campioni sono stati analizzati con la tecnica enzimatica alcol deidrogenasi (EMIT II Plus Dade Behring). La gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) con spazio di testa (Star 3400 CX - Saturn 2000 Varian) è stata utilizzata come test di conferma per i campioni con richiesta forense risultati positivi al test iniziale.

Risultati. Dei 1060 soggetti con richiesta clinica il 58% risultava positivo all'alcol di cui un 66.5% con valori molto alti compresi tra 1.5 g/l - 5 g/l. Il 27% risultavano di sesso femminile e la categoria più numerosa è rappresentata dai soggetti di età compresa tra i 40 - 50 anni. Dei 348 pazienti con richiesta forense 76 (21,8%) risultavano positivi, 45 avevano una concentrazione di alcol molto elevata (> 1.5 g/l) e il 19% risultavano di sesso femminile. La categoria più numerosa è rappresentata dai soggetti di età compresa tra i 20 e 30 anni. Tutti i risultati positivi con il test di screening erano confermati con il metodo gascromatografico con spazio di testa.

Conclusioni. La procedura da noi applicata e la metodologia da utilizzata garantisce il percorso dei campioni, una ottima qualità analitica e la giusta applicazione della normativa.

125

**IL TREND DEL CONSUMO DI STUPEFACENTI NEI SERT DELLA PROVINCIA DI BRESCIA**E. Grassi<sup>1</sup>, F. Speziani<sup>1</sup>, R. Patelli<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. Sanità Pubblica ASL Brescia

I dati relativi alla diffusione delle diverse tipologie di droghe in Italia possono essere desunti da diverse autorevoli fonti tra cui l'OssFAD dell'ISS che fornisce dati sulla tipologia delle sostanze d'abuso e sul tipo di trattamento.

Il presente lavoro intende esaminare i risultati delle analisi tossicologiche eseguite su campioni di urine provenienti dai SerT della provincia di Brescia nel marzo 2000 e nel marzo 2009 per valutare le variazioni del fenomeno d'abuso nei due diversi anni di osservazione

Al Laboratorio di Sanità Pubblica della ASL di Brescia vengono analizzati i campioni urinari per il monitoraggio dello stato di tossicodipendenza provenienti dai SerT della Provincia di Brescia. Le sostanze ricercate sono quelle di maggior rilevanza sociale tra cui: oppiacei, cocaina, THC, amfetamine e BZD. La tecnica utilizzata è una tecnica immunochimica di screening basata sul principio della competizione di legame con l'anticorpo tra l'analita coniugato e l'analita presente nel campione.

Nel marzo 2000 furono analizzati 3016 campioni di cui il 16% era positivo agli oppiacei (2480 richieste) il 14% alla cocaina (2352), il 18% al THC (64), 100% alle BZD (12), 0% alle amfetamine (4). Nel marzo 2009 i campioni analizzati sono stati 4580. Le percentuali di positività le seguenti: 20% per oppiacei, 15% per cocaina, 21% per THC 8% per BZD, 0% per amfetamine. Il numero totale delle analisi da 5536 nel 2000 è passato a 9175 nel 2009 con un aumento superiore di richieste per cocaina (18%) rispetto a oppio, THC, amfetamine e BZD che sono aumentate rispettivamente del 2%, 8%, 2%, e 1%.

L'analisi dei dati evidenzia, in accordo con i dati nazionali, che il numero complessivo dei campioni è aumentato del 52% nel corso degli ultimi nove anni e che le richieste per cocaina sono aumentate di più rispetto alle altre ad indicare un aumento superiore di utenza che utilizza cocaina; la percentuale di positività è in lieve aumento. Emerge inoltre che risulta essere di secondario interesse per i SerT conoscere l'assunzione di BZD e amfetamine a dimostrazione del fatto che il grande consumo di queste droghe interessa soggetti non afferenti ai SerT.

Www.iss.it/ofad/: Relazione annuale al parlamento sullo stato delle tossicodipendenze in Italia 2008.

126

**A RAPID METHOD FOR TRACE ELEMENTS MONITORING IN WHOLE BLOOD**C. Ledda<sup>1</sup>, C. Copat<sup>1</sup>, G. Arena<sup>1</sup>, G. Oliveri Conti<sup>1</sup>, M. Fiore<sup>1</sup>, R. Fallico<sup>1</sup>, S. Sciacca<sup>1</sup>, M. Ferrante<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. G.F. Ingrassia, Igiene e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Catania

Monitoring trace elements is increasingly required to evaluate occupational, environmental and domestic human exposure, therefore it's necessary to put in practise a rapid method. Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) was replaced now with Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP-MS) which permit to evaluate trace elements in whole blood with thoroughness. Moreover this instrument allows to determining different elements until to concentrations below one part for billion (ppb).

Our aim was tweaking a new speedy method for detection of Pb, Cd, Ni, As and Hg in whole blood.

Seronorm Trace Elements Whole Blood Level 1 (L1) and Level 3 (L3), a stable lyophilized human blood, are used like reference standard and control blood. In particular L1 and L3 was diluted with Triton-X 10% (1:10, 1:20, only for L3 1:50) and take to final volume of 5 ml using certificate and calibrate pipette. Than a five point calibration curve was prepared to different range for each element: Pb 0,09-43,70 µg/L; Cd 0,04-0,89 µg/L; Ni 0,08-0,83 µg/L; As 0,09-2,50 µg/L; Hg 0,11-1,77 µg/L.

After calibration we check on performance with a control standard prepared by 120 µl of L3 in 5 ml of Triton-X 10% and expected reference values are: Pb 10,50 µg/L, Cd 0,21 µg/L, Ni 0,20 µg/L, As 0,60 µg/L and Hg 0,43 µg/L.

Samples preparation is very speedy: 500 µl of whole blood are placed in 4.500 µl of Triton-X 10%.

Internal standards have been added to each standard and sample to carried out quality control of intensity measure: for Pb and Cd was used Rh, for Ni and As was used Ga finally for Hg was used Ir.

Recovery is about 98-102% for Cd, Ni, As and nearly 86-94% for Pb and Hg. We are estimating uncertainty of measurement. Sensitivity and accuracy of method will allow use for routine.

127

**ALCOL E GUIDA: O BEVI O GUIDI!**

S. Valaperta<sup>1</sup>, M. Monari<sup>1</sup>, V. Lo Cicero<sup>1</sup>, S. Brambilla<sup>1</sup>, B. Barbieri<sup>1</sup>, R. Assandri<sup>1</sup>, A. Montanelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Cliniche, IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI)

Introduzione. Si ritiene che la riduzione dei livelli consentiti di alcolemia alla guida possa rappresentare un importante passo per contribuire a ridurre i rischi e possibili danni derivanti dal consumo di alcol in particolari contesti. Pertanto, nel prossimo futuro il livello di alcolemia consentito alla guida, in Italia oggi pari a 0.5 g/L, è destinato a diminuire progressivamente in tutti i Paesi Europei, con l'obiettivo di giungere, nel giro di pochi anni, a zero. (In: www.iss.it)

Scopo. Abbiamo preso in esame i dati di alcolemia, raccolti in laboratorio dal 01/03/09 al 24/08/09, relativi a determinazioni eseguite su richiesta del Pronto Soccorso a favore di soggetti coinvolti in incidenti della strada, al fine di esprimere una valutazione sull'abuso di sostanze alcoliche ed in particolare sul possibile impatto dell'adozione del preventivato livello di tolleranza zero.

Materiali e Metodi. Abbiamo analizzato 305 campioni. Il dosaggio dell'alcolemia è stato eseguito con reattivo Etanolo Multigen Abbott, su strumentazione Ci16200 Abbott (Dosaggio cinetico enzimatico, lettura a 340/412 nm. Sensibilità pari a 0.004 g/L; linearità 0.1-6.0 g/L; CV per concentrazioni da 0.49 a 2.34 g/L compreso tra 4.20 e 2.21%) Risultati. Soggetti esaminati 305: M 233-F 72; età media aa: M 43±17-F 39 ±16; alcol positivi 145 pari al 47.5% (M 50.2% - F 38.8%). Distribuzione in percentuale delle alcolemie (g/L) nelle classi di livello previste dalla legge n.160, 2 ottobre 2007: 7.59% (<0.50); 8.97% (0.51-0.80); 17.93% (0.81-1.50); 54.48% (1.51-3.00); 8.28% (3.01-4.00); 2.76% (>4.00).

Valori medi rilevati: M 1.88±1.05; F 2.09±0.74 g/L.

Discussione. I dati raccolti evidenziano che tra i consumatori di sostanze alcoliche solo il 7.59% si è mantenuto al di sotto del livello consentito per la guida. L'adozione di un livello di tolleranza zero, certamente auspicabile, di fatto andrà a sanzionare solo una piccola percentuale in più di soggetti, ma potrà certamente costituire un forte messaggio circa la necessità dell'assoluta astensione dal consumo di alcolici in caso di guida, senza più la possibilità dell'alibi dettato dai "livelli consentiti".

128

**GENOTIPIZZAZIONE DEL POLIMORFISMO CYP2C19\*2 CON UN SAGGIO TAQMAN APPLIED BIOSYSTEMS (AB) SEMPLIFICATO**

N. Lelli<sup>1</sup>, T. Trenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Tossicologia e Diagnostica Avanzata, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino-Estense, Modena

Premessa. I saggi TaqMan della serie TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (DMGA) sono una raccolta di saggi brevettati dalla AB ottimizzati per genotipizzare polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs), nonché piccole inserzioni e delezioni in geni correlati al metabolismo dei farmaci. Tali saggi sono validati su strumentazione AB. Nei saggi TaqMan la discriminazione allelica si basa su due sonde allele specifiche marcate alla estremità 5' con due diversi fluorofori, VIC e FAM.

Conoscendo quale allele corrisponde a VIC e quale a FAM è possibile definire il genotipo dei campioni (wild type WT, eterozigote o omozigote mutato).

Scopo del lavoro. Verificare l'applicabilità di una versione semplificata del saggio per il polimorfismo CYP2C19\*2 (assay ID C\_25986767\_70) sullo strumento Rotor Gene 3000 della Corbett e verificare le frequenze alleliche nella nostra popolazione.

Protocollo. Il protocollo semplificato prevede per ogni reazione 12.5 microlitri di TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 1.25 microlitri di Drug Metabolism Genotyping Assays Mix 20X, 1.0 microlitri di DNA e 10.25 microlitri di acqua. Il profilo termico comprende 10 minuti a 95°C e 50 cicli di 15" a 92°C e 90" a 60°C.

Benché AB (TaqMan DMGA Protocol part n. 4362038 rev.A; 7/2005) richieda una quantità di DNA compresa fra i 3 e i 20 ng, è stato seguito un protocollo semplificato ([http://www.dnagenotek.com/pdf\\_files/MKAN011\\_Taqman.pdf](http://www.dnagenotek.com/pdf_files/MKAN011_Taqman.pdf)) in cui di ogni campione è stato messo 1 microlitri di DNA (non quantificato) corrispondente al DNA estratto da 1 microlitri di sangue intero.

Risultati. Sono stati analizzati in tre sedute 84 campioni di DNA e 6 controlli negativi estratti con diversi kit commerciali [Sample Prep Diatech, HP PCR template purification kit Roche, ZR Genomic DNA II Zimoresearch].

L'analisi di scatter ha evidenziato cluster ben definiti per omozigoti WT (63) ed eterozigoti (21) da cui si evince una frequenza dell'allele minore di 0.125.

Conclusioni. Un protocollo semplificato di un saggio TaqMan AB è utilizzabile su Rotor Gene 3000 per genotipizzare uno SNP (CYP2C19\*2) rilevante per il metabolismo di alcuni farmaci. Nella nostra popolazione la frequenza dell'allele minore risulta leggermente inferiore a quella prevista (0.14).

129

**WORKPLACE DRUG TESTING IN ITALY: ONE YEAR OF EXPERIENCE OF THE FORENSIC TOXICOLOGY LABORATORY, UNIVERSITY OF PAVIA**C. Vignali<sup>1</sup>, C. Stramesi<sup>1</sup>, A. Groppi<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. Medicina Legale Scienze Forensi e Farmaco-Tossicologiche, Università degli Studi di Pavia

In Italy, workplace drug testing (WDT) was definitively regulated by the Government in September 2008, with the title "Protocol about health survey to diagnose the absence of drug dependence in workers whose task is associated with health and safety risks of a third party". This protocol led to the State-Region summit of the 30th of October 2007 and provides for a two-step survey. At first, a urine sample of the worker is submitted for analysis for opiates, cocaine, amphetamines, cannabinoids, methadone and buprenorphine; the occupational physician can choose between an "on-site" test, performed by himself, or immunochemical screening carried out in an authorized laboratory. Positive samples have to be confirmed by a chromatographic technique (GC-MS or LC-MS). The second level of the protocol starts when urine sample results positive. In this case worker is obliged to go to the Public Drug Treatment Unit where they will diagnose whether or not there is drug dependence. The second level survey consists of testing both urine and hair for the same drugs of abuse listed above.

Each Region can enact guidelines and precise statements without change the outline of the protocol. Lombardy published the first version of regulations in spring 2008 while the latest one is dated 22nd of January 2009.

The Forensic Toxicology Laboratory, University of Pavia, began workplace drug testing in July 2008; the Lab is involved in WDT as regards sampling, screening and/or confirmation at the first level of survey and urine and hair analyses for the second level. This study reports our experience during the first year of analyses (July 2008–June 2009); the processed data come only from the First Level Survey where both screening and confirmation analyses are carried out in our Laboratory.

In this period, 4059 workers were tested, 88 resulted positive (2.2%). Cannabinoids were detected in 71% of positive samples while cocaine in 19.4%. Opiates, methadone and buprenorphine represent the 9.6% (2.1%, 6.4% and 1.1% respectively). In five cases two drugs of abuse were detected in urine: methadone and opiates in one case while cocaine and cannabis in four cases. As regard to the task of positive workers more than 80% were applied in handling of goods and only 5% were lorry drivers.

130

**BIOCHIP ARRAY TECHNOLOGY AND WORKPLACE DRUG TESTING: EVALUATING EVIDENCE RANDOX® PERFORMANCE**M. Vidali<sup>1</sup>, R. Rolla<sup>1</sup>, M. Bagnati<sup>1</sup>, V. Bianchi<sup>2</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara<sup>2</sup>Lab. Analisi, Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria

Background and Aim. Biochip Array is an emerging technology, which utilises conventional immunoassay techniques for the simultaneous measurement of analytes on a biochip surface at discrete test regions. In this preliminary study we report on performance of this technology for drug testing in the workplace setting.

Materials and Methods. 60 urine specimens were evaluated by FPIA (Axsym, Abbott) and by Randox Evidence® Biochip Array Technology (Randox Laboratories Ltd., UK), which allows for simultaneous detection of 10 drug classes and creatinine. Positive samples were confirmed by GC-MS. In order to study the effect of adulterants, human samples and blank urines spiked with different amounts of drugs were incubated with HCl, KOH, nitrites, bleach and cationic detergent. A set of controls (Evidence DOA1 low/high, Axsym low/medium/high and Bio-Rad Liquichek C3) were run during all determinations.

Results. Among 60 patients investigated we found 0, 2 and 5 positive samples respectively for MDMA, amph/metamphetamines and methadone, all detected by both FPIA and Evidence. 8, 13 and 20 were positive respectively for opiates (OPIAT), cocaine metabolites (BZG) and cannabinoids (THC), with 9 out of 20 THC+ samples within +/-25% of the cut-off. Concordance between FPIA and Evidence were 60/60 for OPIAT, 59/60 for BZG with 1 sample Evidence+ (370) but FPIA- (297 but 312 when repeated), and 59/60 for THC, with 1 sample FPIA+ (60) but Evidence- (41 and still neg, 47, when repeated). Intra-chip and inter-chip precision, expressed as %CV were typically <=11%. For both platforms, THC was considerably decreased by HCl, bleach and nitrites, but increased by KOH and cationic detergent; OPIAT and BZG were both decreased by KOH and bleach. Evidence provides first data (10 analytes x 9 samples) after 78 min, with 90 new results each 6 min, while Axsym supplies in ideal conditions the first result after 25 min, with subsequent production of 1 analyte/min.

Conclusions. Our data support Biochip Array Evidence Randox as an high-throughput and reliable technology for drug screening in the workplace setting.

Reference

Marchioro et al. Biochips e droghe d'abuso: valutazione del sistema Evidence in confronto con la metodologia KIMS. *Biochim Clin* 2007;31(3):197-204.

131

**MONITORAGGIO DEL TACROLIMUS: RISULTATI ABERRANTI CON IL METODO ACMIA**D. Moscato<sup>1</sup>, A. Nonnato<sup>1</sup>, M. Isabello<sup>1</sup>, S. Vitali<sup>1</sup>, A. Caropreso<sup>1</sup><sup>1</sup>S.C. Biochimica Clinica, A.O.U. San Giovanni Battista-Molinette, Torino

Premessa e scopo. Un monitoraggio accurato dei livelli di Tacrolimus, farmaco antirigetto di frequente utilizzo nei pazienti sottoposti a trapianto, è estremamente importante in ragione del ridotto "range" terapeutico. La segnalazione di alcuni risultati aberranti ci ha indotti a condurre una verifica sistematica dei risultati ottenuti sui nostri campioni di routine.

Metodi. Nell'arco di 16 mesi (gennaio 2008-aprile 2009) abbiamo selezionato tutti i pazienti con valori di Tacrolimus eccedenti il "range" terapeutico (15 ng/mL) senza evidenze cliniche di sovradosaggio o modifiche della posologia del farmaco. I campioni disponibili sono stati analizzati con un metodo di riferimento (cromatografia liquida-tandem massa:LC-MS/MS) e con uno o più test commerciali alternativi al nostro metodo di routine (ACMIA su Siemens-Dade Dimension RxL), valutandone sia la correlazione con LC-MS/MS che gli andamenti nel corso del monitoraggio.

Risultati. Nel periodo di osservazione 10 pazienti (1% di quelli in monitoraggio) hanno presentato livelli falsamente elevati di Tacrolimus. Gli altri metodi (CMIA e MEIA, Abbott; EMIT, Siemens-Dade) hanno fornito risultati marcatamente inferiori su tutti i campioni, tra loro concordanti e con buona correlazione rispetto a LC-MS/MS ( $r^2=0,83$  per EMIT; 0.88 per MEIA; 0.97 per CMIA) mentre non vi era correlazione tra ACMIA e LC-MS/MS ( $r^2=0,01$ ). Due pazienti presentavano dei valori costantemente elevati (5-20 volte rispetto al riferimento) per tutti i nove mesi di osservazione, mentre in tre casi l'elevazione era minore (5-7 volte) e transitoria (2-4 settimane), con ritorno a valori concordanti con gli altri metodi sui campioni successivi.

Conclusioni. I nostri dati confermano alcune segnalazioni recenti sull'evenienza di risultati aberranti per Tacrolimus con il metodo ACMIA (1). Dato che questi risultati non erano riscontrabili con i metodi che prevedono un pretrattamento manuale del campione, riteniamo che la preparazione automatica effettuata dal sistema Dimension non sia in grado di rimuovere le sostanze potenzialmente interferenti con questo dosaggio.

**Bibliografia**

1. Altinier S et al. Heterophilic antibody interference in a non-endogenous molecule assay: an apparent elevation in the tacrolimus concentration. *Chimica Clinica Acta* 2009;402:193-195.

132

**VALIDAZIONE DI UN METODO IN HPLC-EC A COPPIA IONICA PER IL DOSAGGIO DELLO IODIO NELLE URINE**V. Bianchi<sup>1</sup>, F. Martino<sup>1</sup>, A. Pinca<sup>1</sup>, G. Sida<sup>1</sup>, C. Arfini<sup>2</sup><sup>1</sup>Lab. di Tossicologia, Az. San. Osp. SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria<sup>2</sup>Dip. di Patologia Clinica, Az. San. Osp. SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria

Introduzione. Il metodo più comune si basa sulla catalisi dello ioduro nella reazione Ce(IV) giallo-As(V) a Ce(III) incolore-As(III), dopo complesse procedure di digestione. Il metodo di riferimento è l'attivazione neutronica, mentre l'HPLC rappresenta un metodo alternativo.

Scopo di questo lavoro è la validazione di un metodo in HPLC.

Materiali e Metodi. Strumentazione: HPLC Agilent 1200, Rivelatore EC Decade II Antec; Condizioni analitiche 0.15 V, colonna Waters Spherosorb® ODS2 4, 6X150 mm, 5µm con precolonna; Temperatura 35°C, Flusso 1.0 mL/min, Fase mobile: trietilamina 71.9mM, tetrabutylammoniofosfato 5 mM, pH 6.5, metanolo 10% Trattamento del campione: colonnine SPE Merk LiChrolut RP-18 (40-63 µm) 500 mg. Standard certificato: Accustandard, Urina di controllo: Seronorm; Campioni 86 urine (24 h e spot).

Risultati. Il tempo di ritenzione dello ioduro 5,50 minuti. Inaccuratezza: Essa è risultata essere 10% per concentrazioni di 25, 200 e 500 µg/L, 2% per concentrazione di 50 e 100 µg/L. Imprecisione nella serie CV% 2.8% e 1.4% per concentrazione rispettivamente di 50 µg/L e 500 µg/L. Imprecisione tra le serie CV% 3.5%. 2.1% per concentrazione rispettivamente di 50 µg/L e di 500 µg/L. Recupero: è risultato +4%, +7%, +8%, +8% e +15% per concentrazioni di 25, 50, 100, 150, 300 µg/L mentre il LLOQ 6 µg/L (CV% <10%). Linearità 10-500 µg/L. (Conc = 53,074 alt -187,5, R2= 0,9967; Possibili interferenze: Cloruri e bromuri hanno evidenziato un picco nei primi 3 minuti, mentre un picco assegnabile al fluoruro non è stato evidenziato. Urine: i valori ottenuti variano da 12 a 386 µg/mL. Le urine spot risultano più "sporche" di quelle 24h, pertanto vengono diluite 1 a 2.

Conclusioni. Il metodo è accurato, preciso, riproducibile e ripetibile, nonché economico. Anche il recupero è soddisfacente. Non sono state evidenziate interferenze da parte degli altri alogenuri. La fase più lunga è la stabilizzazione del rivelatore che circa 10-15 ore.

**Bibliografia**

Rend J et al. *Exp Clin Endocrin* 1998;106:S34-41.

133

**WORKPLACE DRUG TESTING: LA NOSTRA ESPERIENZA**

R.A. Salvo<sup>1</sup>, G. D'Amico<sup>1</sup>, A. Salomone<sup>1</sup>, A. D'Andrea<sup>1</sup>, A. Mastrone<sup>1</sup>, M. Vincenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Regionale Antidoping "Alessandro Bertinaria"

L'identificazione delle sostanze d'abuso nei fluidi biologici può avere motivazioni di ordine clinico o di tipo amministrativo/medico legale. Dall'autunno 2008 presso il Centro Regionale Antidoping (CAD) afferiscono campioni per l'accertamento di assenza di tossicodipendenza in lavoratori addetti a mansioni che comportano rischi verso terzi (Intesa Stato/Regioni del 30/10/07 e Accordo Stato/Regioni del 19/09/2008). La procedura adottata dal CAD ha previsto l'attivazione della catena di custodia, le cui principali fasi operative sono: 1. Acquisizione di informazioni utili per la compilazione di moduli, ponendo attenzione all'accertamento dell'identità del lavoratore 2. Raccolta a vista e sigillatura del campione diviso in tre aliquote (A: screening, B: conferma e C: controanalisi). Tale raccolta limita fenomeni come la sostituzione del campione e l'additivazione con interferenti delle analisi. Le aliquote sono identificate, chiuse con un sigillo antiviolazione, firmate dal lavoratore e dall'operatore sanitario incaricato del prelievo. 3. La compilazione della modulistica con l'obiettivo di ricostruire l'iter del campione: raccolta, conservazione e/o smaltimento. 4. Trasporto, eseguito nel rispetto della Norma UN3373. All'arrivo del campione si procede alla verifica della congruità con la richiesta e dell'idoneità mediante determinazione della creatinuria. Il passaggio successivo è l'esecuzione dell'analisi di screening con metodo immunometrico (KIMS e/o FPIA) e, in caso di positività, del test di conferma cromatografico. Ad oggi, sono stati analizzati i campioni di 5213 lavoratori (di cui circa il 98% era rappresentato da soggetti di sesso maschile). Le sostanze ricercate, in rispetto alla normativa vigente, sono elencate di seguito, insieme alla relativa percentuale di positività allo screening e di positività confermate: Cannabinoidi (1.7vs1.3%); Cocaina (0.1vs0.1%); Metadone (0.11vs0.10%); Oppiacei (0.35vs0.0%); Amfetamine/Metamfetamine (0.40vs0.0%). Lo studio dimostra, come previsto, un maggiore abuso dei cannabinoidi rispetto ad altre droghe nella popolazione dei lavoratori indagati.

A nostro avviso queste percentuali sottostimano comunque il fenomeno, dato che i controlli sono effettuati con un preavviso minimo.

134

**10-MONTH EXPERIENCE OF A REGIONAL REFERENCE LABORATORY ON WORKPLACE TESTING**

V. Bianchi<sup>1</sup>, F. Martino<sup>1</sup>, S. Piccinini<sup>1</sup>, A. Pinca<sup>1</sup>, G. Sida<sup>1</sup>, C. Arfini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Reference Lab. of Toxicology, SS Antonio e Biagio Hosp. Alessandria

<sup>2</sup>Dept. of Clinical Pathology, SS Antonio e Biagio Hosp. Alessandria

Background and Aim. Last October, an agreement between Regions and Central Government on workplace testing has been approved. The document precisely specifies both laboratory requirements and procedures as well as classes of workmen exposed at the risk of accidents. In Piedmont three laboratories were identified as reference laboratories, being qualified for both screening and confirmatory tests. In this work we report on our experience and data about the first ten months of activity.

Materials and Methods.

Timing: from 10.09.2008 until 08.08.2009

People: identified by the Employer among workmen at risk, according with the law

Sample collection: with chain of custody (3 amounts) after personal identification

Analytes: amphetamine/methamphetamine, THCCOOH, cocaine metabolites, opiates, methadone, MDMA in urine. Screening tests by Axsym (Abbott) and EIA microplates for MDMA (Bio-Rad)

Confirmatory tests by GC-MS (Agilent 6970)

Results. 2145 people (male 94%, female 6%) have been evaluated. In particular 85% of people used dangerous machines and 12% had special driving licences. At the screening test we found "positives" 25 workmen for cannabis, 8 for cocaine metabolites, 5 for opiates, 1 for methadone: all samples were confirmed by GC-MS, but 4 opiates. In particular, in these 4 urines we detected codeine contained in drugs used for pain management (Coefferalgan®). We have also received urine samples from other laboratories for confirmatory tests: 2 MDMA (not confirmed), 14 THCCOOH (12 confirmed), 4 cocaine metabolites (confirmed), 7 opiates (4 confirmed as morphine, 2 as codeine and 2 not confirmed).

Conclusions.

Our experiences shows:

-1,7% of the working population used abuse drugs

-The most used drugs were cannabinoids and to a lesser extent cocaine

-Somebody did not declare use of methadone

-It is very important to recommend a similar law for alcohol abuse and introduce specific biomarkers in serum (CDT) or/and in hair (EtG).

References

Document 18th September, 2008 GU n 236 10/08/2009

135

**DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI: LORAZEPAM, TIOPENTONE, MIDAZOLAM**

P. Pigni<sup>1</sup>, A. Calcinari<sup>1</sup>, A.M. Gambini<sup>1</sup>, S. Marinelli<sup>1</sup>, A. Nisi<sup>1</sup>, G. Scarpini<sup>1</sup>, M. Tocchini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Azienda Osp. Riuniti, Ancona

La sedazione e l'analgesia rappresentano necessità quasi imprescindibili per i pazienti che versano in condizioni critiche.

In anni recenti è diventata una pratica sempre più comune mantenere in stato di sedazione continua i pazienti ricoverati presso le unità di Terapia Intensiva (TI). Fino ai tempi più recenti la posologia dei farmaci veniva stabilita in base al loro effetto sedativo. Attualmente si ritiene necessario modificare questo atteggiamento per evitare uno stato di coma ingiustificato, dal momento che spesso i pazienti vengono tenuti eccessivamente sedati. L'obiettivo di questo studio è stato di mettere a punto un metodo sensibile, riproducibile, rapido che permetta di monitorare i livelli plasmatici di diversi sedativi/ipnotici al fine di ottimizzare la terapia individuale e di controllare l'eventuale imprevedibilità del metabolismo di questi farmaci.

Il metodo da noi studiato prevede la determinazione contemporanea di 3 sedativi/ipnotici: Lorazepam, Midazolam, Tiopentone dopo estrazione in fase solida dalla matrice plasmatica. L'analisi viene eseguita in HPLC utilizzando: colonna analitica C18, 5mm, 4,6x150mm; fase mobile costituita da 600ml di tampone acetato 0.05M a pH6,5 e 400ml di acetonitrile; flusso di 1,2ml/min. L'eluato è monitorato a 245nm. Il tempo di eluzione è di 14min. Il flunitrazepam è stato utilizzato come Standard Interno. Per ogni analita sono stati determinati le rette di regressione, l'intervallo di linearità, il recupero medio%:

LORAZEPAM:  $y=0.0073x+0,21$ ;  $R^2=0.999$ ; 24-6250ng/ml; 107;

MIDAZOLAM:  $y=0.0038x-0,032$ ;  $R^2=1$ ; 25-10000ng/ml; 122;

TIOPENTONE:  $y=0.9865x+1,23$ ;  $R^2=0.999$ ; 0,25-121mcg/ml; 95.

La precisione e l'accuratezza sono state valutate analizzando in giorni diversi campioni di sangue di donatori a cui sono state aggiunte 3 differenti concentrazioni dei 3 analiti. I coefficienti di variazione variano dal 1,7% al 3,5%, confermando che il metodo descritto risponde alle esigenze di riproducibilità e accuratezza. La buona linearità all'interno di un ampio intervallo di concentrazioni permette di monitorare i 3 analiti sia nei pazienti in TI sia quando come nelle donazioni d'organo si deve accertare la non presenza dei farmaci nel plasma.

**Bibliografia**

Comperano WB et al. Critical Care Medicinal 1998;26:676-84.

136

**DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEL FARMACO ANTITUMORALE MITOTANE E DEI SUOI METABOLITI NEL SIERO: OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DEL METODO IN HPLC**

R. Ciuti<sup>1</sup>, G. Ciotta<sup>1</sup>, A. Michahelles<sup>1</sup>, M. Mannelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro di Riferimento Regionale per il dosaggio di farmaci e droghe d'abuso su liquidi biologici, AOU Careggi, Firenze

<sup>2</sup>D.A.I. Endocrinologia, AOU Careggi, Firenze

Il carcinoma del cortico-surrene (ACC) è una neoplasia rara (0.5-2 casi x milione) ed è responsabile dello 0.1% dei decessi per cancro in Italia. La diagnosi spesso tardiva e la notevole aggressività biologica fa sì che un'elevata % di pazienti giunge dal medico con malattia avanzata (stadio III-IV). Il trattamento è prevalentemente chirurgico seguito da chemioterapia e radioterapia. La terapia farmacologica di elezione è quella che consiste nella somministrazione di 1-6 gr/die di Mitotane (solo recentemente fruibile in Italia come Lysodren<sup>®</sup>) associato a cisPlatino, con questo protocollo la sopravvivenza è del 50% a 5 anni.

Il Mitotane è un farmaco chimicamente simile al noto insetticida DDT, si tratta del 1,1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano o o,p'DDD. La sua elevata tossicità e il suo stretto intervallo terapeutico (da 14 a 20 mg/l) rende indispensabile il suo monitoraggio nel siero.

Metodica da noi messa a punto in HPLC: lo strumento utilizzato è un Agilent 1100 (BioRad), colonna C8 (Chromsystems), estrazione esano/isopropanolo 1:1, lunghezza d'onda: 218 nm, fase mobile Acetonitrile all'80% in ambiente acido per acido fosforico (pH=4.0), lo standard interno è il DDT. In queste condizioni è possibile separare oltre che il mitotane e il DDT anche i suoi principali metaboliti: il o,p'DDA e il o,p'DDE. La precisione tra le serie riscontrata è stata del 7.9% e il LOQ di 0.4 mg/l.

I livelli medi riscontrati su 30 pazienti con dosaggi di 3-4 mg/die sono stati: DDD= 13.8±12.9; DDA=60.6±49; DDE=3.1±1.1.

Concludendo si può affermare l'assoluta attendibilità del metodo di dosaggio di questo farmaco che tuttora rimane l'unico presidio medico per allontanare la recidiva del tumore. L'utilità del riscontro dei metaboliti non è ancora chiarita a livello della letteratura internazionale, il DDA meno lipofilo del DDD e DDE sembrerebbe meno attivo farmacologicamente degli altri due.

**Bibliografia**

Kirschner LS, Emerging Treatment Strategies for Adrenocortical Carcinoma: A New Hope; J of Clin Endoc & Metabolism 2006;91:14-21.

137

**DETERMINAZIONE DELLA TRANSFERRINA CARBOIDRATO-CARENTE (CDT) E DELLA GAMMA-CDT NEI GUIDATORI CON ABUSO ALCOLICO**V. Bianchi<sup>1</sup>, A. Ivaldi<sup>1</sup>, C. Arfini<sup>2</sup>, M. Vidali<sup>3</sup><sup>1</sup>Lab. di Tossicologia, Az. San. Osp. SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria<sup>2</sup>Dip. di Patologia Clinica, Az. San. Osp. SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria<sup>3</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Az Ospedaliero Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Introduzione. La CDT, marcatore specifico di abuso alcolico, è utilizzata nella medicina del traffico per valutare pesanti bevitori. La misura della CDT non è stata ancora completamente standardizzata e manca un consenso su metodi e cut-off. Sono state proposte combinazioni matematiche di marker, come la gamma-CDT utilizzata da Anttila (2). Scopo di questo lavoro è valutare la CDT, misurata con il metodo di riferimento, e gamma-CDT nei guidatori. Materiali e Metodi.

Gruppo A: 652 (336 m, 316 f) astemi o moderati bevitori (indicazioni WHO) come controlli;

Gruppo B: 603 (552 m, 51 f) soggetti sottoposti al giudizio di idoneità alla guida dopo un programma di riabilitazione per abuso alcolico;

Gruppo C: 105 (78 m, 27 f) soggetti fermati alla guida con EtOH > 0,5 g/L.

CDT: misurata ed espressa secondo le raccomandazioni IFCC.

$\gamma$ -CDT calcolata come gamma-CDT =  $0.8 \times \ln(\text{GGT}) + 1.3 \times \ln(\text{CDT})$  (2).

EtOH: misurato in HS-GC/MS con colonna capillare di 90 m.

Risultati. I valori di cut-off per CDT e gamma-CDT erano rispettivamente 1.8%, 4.15 (maschi) e 3.56 (femmine). Il 3% ed il 27% dei guidatori del gruppo B e del gruppo C erano positivi alla CDT. I dati hanno evidenziato un'associazione significativa tra livelli di EtOH e CDT, con una prevalenza del 49% di abusatori cronici tra i guidatori con etanolo superiore a 2.5g/L. Dal confronto CDT e gamma-CDT si è evidenziato un accordo moderato: nel gruppo B, 9 su 16 guidatori positivi per CDT erano anche positivi per gamma-CDT, mentre 15 su 24 guidatori positivi per gamma-CDT erano negativi per CDT, di cui 9 con valori di CDT perfino inferiori al 90° percentile (1.20%) dei controlli. Dati sovrapponibili erano evidenti anche nel gruppo C. Conclusioni. L'impiego della CDT in ambito forense ed amministrativo rende assolutamente primaria una condivisione di metodi e cut-off. Questo studio evidenzia che una rilevante proporzione di guidatori con alti livelli di EtOH sono abusatori cronici. Inoltre, nella medicina del traffico la gamma-CDT, validata con metodi immunometrici, non può essere applicata nella sua attuale forma ma rivalutata sulla base di valori ottenuti con un metodo di riferimento.

**Bibliografia**

1. Helander A et al. Clin Chem 2003;49:1881-90.
2. Anttila P et al. Clin Chim Acta 2003;338:45-51.

138

**SVILUPPO DI UN METODO IN HPLC PER IL DOSAGGIO DI LEVOBUPIVACAINA DOPO ANESTESIA LOCOREGIONALE**P. Porta<sup>1</sup>, M. Vidali<sup>1</sup>, M. Bagnati<sup>1</sup>, M. Albertario<sup>1</sup>, N. Atzeni<sup>1</sup>, D. Scarano<sup>1</sup>, G. Tornotti<sup>1</sup>, C. Ceffa<sup>2</sup>, S. Aina<sup>2</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara<sup>2</sup>U.O. a Direzione Universitaria di Anestesia e Rianimazione, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Introduzione e Scopo. La levobupivacaina è un potente anestetico locale utilizzato frequentemente in ambito ospedaliero per realizzare blocchi nervosi periferici. A causa delle sue proprietà aritmogena e depressiva sul miocardio, essa presenta una potenziale cardiotoxicità che può talvolta esitare in arresto cardiaco. Scopo del lavoro è stato sviluppare un metodo per valutare la concentrazione plasmatica di levobupivacaina, utile nello studio di protocolli personalizzati di anestesia locoregionale.

Materiali e Metodi. Dopo estrazione liquida (plasma:acetone:nitrile:t-butilmetiletero, 500:100:3000µl) ed evaporazione della fase organica, il residuo viene ripreso con 200µl di fase mobile. L'analisi viene eseguita mediante eluizione con tampone fosfato 20mM pH 6 (A) e acetone:nitrile (B), colonna C18 100mm x 4,6mm, 3,5µm, temperatura 35°C, flusso 1ml/min, vol iniezione 20 µl, assorbanza 212nm, gradiente: 50% B per 4,5 min, 50-80% B lineare in 0,5 min, 80% B per 3 min, 80-50% B lineare in 0,5 min, 50% B per 4,5 min.

Risultati. Il recupero a 125, 1000 e 5000ng/ml era rispettivamente 90% (DS 4%), 96% (DS 1%) e 93% (DS 1%) con LOQ di 31,25ng/ml. La ripetibilità stretta e quella intermedia (metodo ANOVA) a 125, 1000 e 5000ng/ml erano rispettivamente 3,9% e 4,0%, 3,1% e 3,6%, 1,5% e 4,3%. La curva di calibrazione (regressione pesata 1/x) era lineare tra 125 e 5000ng/ml (R<sup>2</sup>=0,9995). Nessun picco interferente è stato evidenziato in sieri di pazienti (n=20) ricoverati (terapia intensiva, nefrologia, traumatologia), nè in sieri emolizzati e/o addizionati con mepivacaina, midazolam, propofol. L'analisi di prelievi seriati di 3 pazienti (t0-3h, intervallo 30 min), trattati con levobupivacaina (dosaggio medio 2,81mg/kg), ha evidenziato in un solo caso livelli plasmatici superiori (>2000ng/ml) alla soglia di tossicità riportata in letteratura.

Conclusioni. Il metodo presentato risulta essere veloce e facilmente applicabile per determinare i livelli plasmatici di levobupivacaina in ambito clinico, dopo anestesia locoregionale, o in indagini forensi.

**Bibliografia**

- Tanaka E. et al. Simultaneous determination of three local anesthetic drugs from the pipercoloxylidide group in human serum by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B 2006;834:213-216.

139

**SVILUPPO DI UN METODO IN HPLC PER IL DOSAGGIO DI RUFINAMIDE**

M. Bagnati<sup>1</sup>, M. Vidali<sup>1</sup>, M. Albertario<sup>1</sup>, N. Atzeni<sup>1</sup>, D. Scarano<sup>1</sup>, P. Porta<sup>1</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

**Introduzione e Scopo** La rufinamide è un farmaco anticonvulsante di recente introduzione utilizzato in pazienti di età pari o superiore a 4 anni per trattare una rara forma di epilessia chiamata sindrome di Lennox-Gastaut. Come per altri farmaci antiepilettici, il monitoraggio plasmatico gioca un ruolo rilevante nella valutazione dell'efficacia terapeutica e nell'ottimizzazione della terapia. Scopo del lavoro è stato sviluppare una metodica in HPLC di semplice e rapida esecuzione in alternativa a quelli già descritti in letteratura.

**Materiali e Metodi.** 100 µl di plasma (bianco, campione, standard), miscelati con 100 µl di acetonitrile, sono deproteinizzati con 100 µl di acido metafosforico 5%. L'analisi viene eseguita mediante eluizione con tampone fosfato 20mM pH 6,53:acetonitrile (81:19) in un HPLC-DAD Agilent 1200 con colonna C18 100mm x 4,6mm, 3,5µm, temperatura 35°C, flusso 1,2ml/min, volume di iniezione 20 µl, rivelazione UV a 212nm. Come calibratori si utilizza un pool di sieri bianchi a cui è stata aggiunta una quantità nota di standard.

**Risultati.** Il recupero a 5 e 40 mg/l era rispettivamente 99,9% (DS 1,1%) e 103,7% (DS 1,6%). La ripetibilità stretta (n=15) a 0,5, 5 e 40 mg/l era rispettivamente 2,9%, 1,3% e 0,5%. La curva di calibrazione era lineare tra 0,2 e 80mg/l ( $R^2=0,9999$ ) con LOQ (CV%<5%) di 0,2 mg/l (range terapeutico della rufinamide da 1-50 mg/l). Nelle condizioni cromatografiche descritte il tempo di ritenzione per la rufinamide è risultato essere di 4,7 min.

**Conclusioni.** Il metodo presentato risulta essere veloce, semplice e robusto, rappresentando una valida alternativa ai metodi già pubblicati (estrazione liquido-liquido o SPE seguiti da HPLC).

**Bibliografia**

Brunner LA, Powell ML. An automated method for the determination of a new potential antiepileptic agent (CGP 33101) in human plasma using high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 1992;6(6):278-82.

140

**SVILUPPO DI UNA METODICA HPLC PER LA DETERMINAZIONE SU PLASMA UMANO DEGLI ENANTIOMERI DEL METADONE E SUA APPLICAZIONE CLINICA NELLA PROGNOSE DELLA TOSSICOMANIA EROINICA**

A. Michahelles<sup>1</sup>, R. Ciuti<sup>1</sup>, G. Mannaioni<sup>2</sup>, F. Moroni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Regionale di Riferimento per il dosaggio di farmaci e droghe in liquidi biologici, A.O.U. Careggi, Firenze

<sup>2</sup>Dip. Farmacologia, Università degli Studi di Firenze

**Obiettivi.** L'attività terapeutica del metadone (MT) è da attribuire alla forma R della molecola mentre, per motivi di costo, la forma racemica R/S metadone è quella comunemente utilizzata in clinica. Non esiste una base razionale per stabilire quali siano le dosi di metadone più "appropriate" da utilizzare in ciascun paziente. Recenti studi hanno dimostrato che mantenere una concentrazione plasmatica di R metadone ( $[R-MT]_{plasma}$ ) compreso tra 100 e 250 ng/ml determina un miglior risultato terapeutico (Eap et al., 2000). Scopo dello studio consiste nel somministrare dosi di metadone tali da mantenere le concentrazioni plasmatiche di principio attivo nel "range ottimale" in modo da migliorare la terapia verificando l'ipotesi che la somministrazione di dosi appropriate di farmaco permetta di ridurre la percentuale di coloro che abbandonano i contatti con la struttura sanitaria, i periodi di abuso di eroina, cocaina, anfetamine, alcool e facilitare i rapporti familiari e lavorativi diminuendo infine l'attività criminale.

**Metodi.** Gli enantiomeri R/S del MT vengono estratti dal plasma con un'estrazione liquido/liquido in n-esano e separati tramite colonna chinale AGP. Sia i due enantiomeri che lo standard interno (imipramina) vengono rilevati con metodica UV (lunghezza d'onda 210 nm).

**Risultati.** Il rapporto  $[R-MT]_{plasma}/[S-MT]_{plasma}$  mostra una ampia variabilità interindividuale (range compreso tra 0.67-1.82). I dati analizzati hanno rivelato una scarsa correlazione tra la dose somministrata e la concentrazione plasmatica dei due enantiomeri (R-MT  $r^2=0.23$ , S-MT  $r^2=0.16$ ).

**Conclusioni.** Il rapporto R/S-MT conferma la stereoselettività nel metabolismo del MT con una alta variabilità interindividuale. Questo dato ha confermato la necessità del dosaggio plasmatico dei due enantiomeri per correlare la concentrazione del MT plasmatico con la risposta terapeutica. Infine, la scarsa correlazione tra la dose somministrata e la concentrazione plasmatica dei due enantiomeri conferma la necessità di modificare la terapia metadonica per raggiungere il proposto range terapeutico.

**Bibliografia**

1. Eap et al. *Drug Alcohol Dependence* 2000;61:47-54.

141

### OTTIMIZZAZIONE DEI METODI PER IL DOSAGGIO DI ANTIEPILETTICI NELLA ROUTINE DI UN LABORATORIO ANALISI

M. Bagnati<sup>1</sup>, M. Vidali<sup>1</sup>, M. Albertario<sup>1</sup>, N. Atzeni<sup>1</sup>, D. Scarano<sup>1</sup>, P. Porta<sup>1</sup>, G. Tornotti<sup>1</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Le richieste di dosaggio di antiepilettici di nuova generazione sono in continuo aumento. In particolare, nel nostro Laboratorio il numero di determinazioni per lamotrigina (LAMO), oxcarbazepina (OXCA) e levetiracetam (LEVE) sono aumentate da 276 (80 LAMO, 164 OXCA, 32 LEVE) nel 2007 a 511 (128 LAMO, 181 OXCA, 202 LEVE) nel 2008 e a 1065 (238 LAMO, 305 OXCA, 521 LEVE) nel 2009 (previsione a 12 mesi basata sui dati gennaio-luglio). Due metodi analitici (LAMO/OXCA e LEVE) precedentemente validati, completamente differenti per preparativa e analisi HPLC, sono stati ottimizzati per rispondere più appropriatamente alle richieste dei pazienti.

La preparazione e l'analisi (fase mobile e colonna) dei campioni sono state uniformate: 100µl di plasma sono deproteinizzati con 200µl di acido metafosforico 5%; dopo centrifugazione, 200µl di surnatante sono diluiti con 300µl di tampone fosfato 20mM pH 6,53. L'analisi è condotta in un Agilent 1200 HPLC-DAD con colonna C18 100mm x 4,6mm, 3,5µm, lettura 212nm, flusso 1,2ml/min, vol iniezione 20µl, fase mobile costituita da tampone fosfato 20mM pH 6,53 (A) e acetonitrile (B). Prima vengono caricati i campioni analizzati per LAMO/OXCA (A 81%, B 19%), a cui seguono 5 min (A 100%) e 5 min (A 97% e B 3,5%), e successivamente i campioni per LEVE (A 97% e B 3,5%). I dati della nuova validazione sono sovrapponibili a quelli della precedente: range di linearità, LOD, imprecisione e accuratezza sono rispettivamente 1-100mg/l (R2=0,998), 0,3mg/l, 1% e 96% (DS 2,7%) per LAMO; 0,5-80mg/l (R2=0,999), 0,1mg/l, <1% e 98% (DS 2,4%) per OXCA; 0,5-100mg/l (R2=0,999), 0,2mg/l, 2,3% e 105% (DS 4,6%) per LEVE. La durata dei cromatogrammi è pari a 6 (LAMO/OXCA) e 8 min (LEVE). Il metodo LAMO/OXCA consente inoltre la determinazione di fenobarbitale, zonisamide ed etosuccimide (attualmente in uso).

L'ottimizzazione descritta, già implementata in routine, presenta numerosi vantaggi: risparmio di tempo e fase mobile, riduzione della frequenza di errori nella preparazione dei campioni, possibilità di determinare più analiti utilizzando un'unica preparativa (tra gennaio-luglio 2009, 28 pz avevano una richiesta per LAMO/OXCA e LEVE).

#### Bibliografia

Tomson T, Johannessen SI. European Journal of Clinical Pharmacology 2000;55:697-705.

142

### ASSESSMENT OF FETAL AND CHILDHOOD EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE AFTER RECENT IMPLEMENTATIONS OF SMOKE-FREE POLICY BY HAIR AND URINE TESTING

E. Marchei<sup>1</sup>, M. Pellegrini<sup>1</sup>, M.C. Rotolo<sup>1</sup>, S. La Grutta<sup>2</sup>, F. Cibella<sup>2</sup>, S. Di Carlo<sup>1</sup>, A. Bacosi<sup>1</sup>, O. Garcia Algar<sup>3</sup>, G. Cuttitta<sup>2</sup>, R. Pacifici<sup>1</sup>, S. Pichini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome

<sup>2</sup>Italy Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare, Palermo, Italy

<sup>3</sup>Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Paediatric Service, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

**Introduction.** The scientific community agrees to consider tobacco smoking as the main cause of morbidity and avoidable mortality today. Smoking prevention and the fight against tobacco consumption are within the primary objectives of the health policies in the international community. We investigated fetal and childhood exposure to environmental tobacco smoke (ETS) after recent implementation of the Italian and Spanish smoke-free legislation using cord blood, urine and hair testing for cotinine and nicotine respectively.

**Methods.** Italian study subjects were 372 young adolescents between 10-16 years while in Spanish studies subjects were 416, 290 and 208 neonates born in 1998, 2005 and 2008 respectively. Urinary and cord blood cotinine were analyzed using a double antibody radioimmunoassay. Hair nicotine and cotinine were detected by a validated Gas chromatography-mass spectrometry assay.

**Results.** Based on levels of cord serum cotinine Spanish newborns not exposed to ETS shifted from 10.8 to 57.7 and 73.4% from 1998 to 2005 and 2008, while those exposed to both ETS and maternal smoking decrease from 34.2, 22.0 and 14.4% in the same years. Based on urinalysis and hair testing, 89.0 and 65.6% children from Italian cohort resulted acutely and chronically exposed to ETS, with only 1.6 and 8.6% presenting acute and chronic exposure to high levels of ETS.

**Conclusions.** Due to implementation of smoke-free legislation and information campaigns against smoking a significant trend towards less exposure to ETS was observed both in newborn and young adolescents from two Mediterranean cities, which in the past presented high levels of pediatric exposure to adult smoke.

143

**ETHYLGLUCURONIDE AND ETHYLSULPHATE IN MECONIUM AS POTENTIAL BIOMARKERS OF INTRAUTERINE EXPOSURE TO ALCOHOL: PRELIMINARY RESULTS FOR POPULATION BASELINE CONCENTRATION**

L. Morini<sup>1</sup>, E. Marchei<sup>2</sup>, F. Vagnarelli<sup>3</sup>, M. Pellegrini<sup>2</sup>, O. Garcia-Algar<sup>4</sup>, M.C. Rotolo<sup>2</sup>, S. Pichini<sup>2</sup>, R. Pacifici<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Legal Medicine and Public Health, University of Pavia, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Drug Research and Medicine Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

<sup>3</sup>Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

<sup>4</sup>Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Paediatric Service, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

**Introduction.** Ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (EtS), minor non-oxidative products of ethanol metabolism, have been investigated in meconium as potential alternative markers as gestational exposure to ethanol.

**Methods.** EtG and EtS were quantified by liquid chromatography tandem mass spectrometry in 109 meconium samples obtained from the Hospital del Mar of Barcelona, Spain (N = 59) and from the Neonatal Intensive Care Unit of Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy (N = 50). Information on alcohol consumption was obtained by structured questionnaire. In both groups the mother-infant dyads were similar in sociodemographic and ethnic characteristics. To set up a population baseline range, EtG and EtS concentration in meconium of newborns from women who declared to be teetotalers or who did not drink at all during pregnancy were considered, taking into account only samples with total FAEEs concentration lower than 2 nmol/g, the cut-off used to differentiate daily maternal ethanol consumption during pregnancy from occasional or no use.

**Results.** Ninety-one meconium samples (83.5%) tested positive for EtG, 15 (13.8%) for EtS. In the Italian cohort, EtG showed concentrations ranging from 0.02 to 1.87 nmol/g (median 0.10 nmol/g) while in the Barcelona EtG varied from 0.03 to 1.57 nmol/g (median 0.14 nmol/g). EtS concentration ranged from 0.003 to 0.016 nmol/g (median 0.008 nmol/g) in the Italian cohort and from 0.005 to 0.034 nmol/g (median 0.017 nmol/g) in the Spanish one. Since EtS concentration in meconium samples from newborns of non-drinking women was undetectable in the majority of samples, only EtG concentration was evaluated. A concentration range of 0.02–1.87 nmol/g (medium value: 0.12 nmol/g) resulted indicative of no gestational ethanol, overlapping the range of 0.04–3.11 nmol/g (medium value: 0.24 nmol/g) for occasional use, while in case of daily ethanol consumption EtG concentration range was 0.02–8.34 nmol/g (medium value: 0.22 nmol/g).

**Conclusion.** Results showed that EtG in meconium appear to be potential good marker to properly assess prenatal exposure to ethanol and even to estimate a potential ethanol amount ingested for an early neonatal diagnosis and proper follow-up.

144

**METHYLPHENIDATE AND RITALINIC ACID ORAL FLUID LEVELS IN HEALTHY VOLUNTEERS: CORRELATION WITH PLASMA DRUG CONCENTRATIONS**

E. Marchei<sup>1</sup>, O. Garcia-Algar<sup>2</sup>, M. Farré<sup>3</sup>, M. Pellegrini<sup>1</sup>, I. Palmi<sup>1</sup>, M.C. Rotolo<sup>1</sup>, S. Pichini<sup>1</sup>, R. Pacifici<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Drug Research and Medicine Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

<sup>2</sup>Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Paediatric Service, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Bioanalysis and Analytical Services Research Group, Neuropsychopharmacology Program, Institut Municipal d'Investigació Mèdica IMIM-Hospital del Mar and Universitat Autònoma, Barcelona, Spain

**Introduction.** Interest in oral fluid as an alternative matrix for monitoring drug use is due to its ease-of-collection and non-invasiveness. We studied the excretion profile of methylphenidate (MPH) and its metabolite ritalinic acid (RA) both in oral fluid and plasma, and the eventual correlation in drug concentration in these two fluids

**Methods.** Oral fluid and plasma samples were obtained from eight healthy volunteers after ingestion of a single dose of both 20 mg short and extended release MPH formulation. Concentrations of MPH and RA in oral fluid and plasma were measured by liquid chromatography-mass spectrometry. Apparent pharmacokinetic parameters of MPH in oral fluid were estimated, and oral fluid-to-plasma (OF/P) ratio at each time interval was calculated and correlated with salivary pH.

**Results.** Oral fluid concentrations of MPH ranged between 0.5-466.7 µg/L and peaked at 0.5 h after short release formulation administration and ranged between 0.7-89.5 µg/L and peaked at 2 h after extended release formulation administration. Concentration peaks were followed by a progressive decrease, with a almost undetectable concentrations at 24 h post administration. OF/P ratio ranged between 1.8-242.1, with a peak of 78.2 at 0.5 h and a second peak of 8.9 at 8 h after short release formulation administration and between 2.6-27.0, with a peak of 13.4 at 2 h and a second peak of 16.2 at 8 h after extended release administration. In short release volunteers, OF/P ratios showed a correlation with oral fluid MPH concentrations (r = 0.77). No correlation was found between OF/P ratios and plasma concentrations and oral fluid pH. MPH concentrations were correlated to plasma concentrations (r = 0.63). Oral fluid pH seemed to be slightly affected by short release formulation administration; pH values decreased by 0.2 units (mean values of 6.9 at 3 h after drug administration vs. 7.1 at pre-doses)

**Conclusions.** These first results showed that the pharmacokinetic profiles of both formulations were similar and the measurement of MPH in oral fluid appears to be a suitable alternative to plasma analysis in clinical and toxicological situations.

145

**INTERFERENZA DA ANTICORPI ETEROFILI SUL DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO A DOPPIO SITO (SANDWICH) DELLA TROPONINA I**F. Veneziani<sup>1</sup>, F. Petrucci<sup>1</sup>, A. Rossi<sup>2</sup>, A. Lagi<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratorio d'Analisi P.O. Santa Maria Nuova<sup>2</sup>D.E.A. P.O. Santa Maria Nuova

La troponina cardiaca è un marcatore sensibile e specifico di danno miocardio. In letteratura sono segnalati casi di incremento spurio delle troponine legati ad interferenze di diversa natura soprattutto da anticorpi eterofili presenti nel campione in esame sul risultato dei dosaggi immunochimici a doppio sito (sandwich). Gli anticorpi eterofili sono imputabili il 22 % dei falsi positivi nei dosaggi immunochimici.

Vengono descritti 2 casi di incremento spurio di Troponina I legato ad interferenze da anticorpi eterofili. Si tratta di due soggetti giunti in DEA per dolore toracico con documentazione di valori patologici di troponina I che rimanevano costanti nel tempo, con ECG ed altri test negati per cardiopatia.

Sospettando la possibilità, in entrambi i casi, di falsa positività da anticorpi eterofili abbiamo pretrattato i campioni in esame con la metodica HBT (Heterophilic Blocking Tube): il sistema è costituito da una provetta che contiene specifici leganti i quali sottraggono gli eventuali anticorpi eterofili in modo che essi non siano più in grado di influenzare la reazione. Il dosaggio di Troponina I eseguito sui plasmi pretrattati ha dato come risultato rispettivamente in un caso valori di 0,52 mg/dl, nel secondo caso invece non vi sono state variazioni significative 0,27 come valore di base e 0,25 mg/dl dopo trattamento. La significativa diminuzione del valore di Troponina I in un caso dimostra la presenza di anticorpi eterofili nel plasma in studio; tuttavia ci troviamo verosimilmente nella situazione in cui il campione contiene una quantità estremamente elevata di anticorpi eterofili, tale che il metodo non è in grado di bloccare totalmente l'interferenza. Nel secondo caso invece il trattamento non ha determinato riduzione del valore della troponina; avendo escluso altre potenziali cause di falsa positività, si può ipotizzare un approfondimento dell'analisi con kit di differente specificità rispetto al kit HBT.

La particolarità di uno dei due casi descritti consiste nel fatto che in letteratura non vengono descritti casi di incremento spurio di troponina legato ad interferenze da anticorpi eterofili che raggiungessero valori così elevati e che non si normalizzassero dopo esposizione del campione al sistema HBT.

146

**ESPRESSIONE DI AUTOANTICORPI ANTI-RNA POLIMERASI III IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA**T. Imbastaro<sup>1</sup>, M. Di Cicco<sup>2</sup>, M. Lisanti<sup>1</sup>, C.Diodati<sup>1</sup>, M.P. Fiorilli<sup>1</sup>, A.M. Marini<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O.S.D. Diagnostica delle Malattie Autoimmuni, Dip. di Patologia Clinica, Osp. Spirito Santo, Pescara<sup>2</sup>U.O.C. Reumatologia, Osp. Spirito Santo, Pescara

Scopo della ricerca. La sclerodermia (sclerosi sistemica, SSc) è una malattia del tessuto connettivo caratterizzata da fibrosi della pelle, della parete vascolare, del sistema muscolo-scheletrico, e da disfunzioni vascolari e degli organi interni. Dal punto di vista diagnostico nel siero di pazienti sclerodermici si possono riscontrare specifici autoanticorpi diretti contro diversi antigeni nucleari, quali la topoisomerasi I, le proteine centromeriche e l'RNA polimerasi III. Tali autoanticorpi hanno alto grado di specificità e sono associati a diversi quadri clinici della malattia. In particolare abbiamo studiato la presenza di anticorpi anti RNA polimerasi III, ritenuto un marker clinicamente utile di SSc, poiché la loro presenza è associata alla forma diffusa della malattia ed un aumentato rischio di coinvolgimento cardiaco e renale.

Materiali e Metodi. Abbiamo dosato anticorpi antinucleo (ANA) e anticentromero (ACA), antitopoisomerasi I e anti RNA polimerasi III su campioni di siero provenienti da una coorte di 60 pazienti affetti da SSc in trattamento con infusione mensile di prostanoidi. I 60 pazienti (59 femmine e 1 maschio) avevano un'età media di 52 anni (range 19-77). I kit utilizzati sono Kallestad HEP-2 Cell Line Substrate (Biorad) in IFA, Quanta Lite Scl-70 in ELISA (Inova), per anti RNA polimerasi III, il kit in ELISA prodotto da MBL, Tokyo, Japan e gentilmente fornito da Dasit, Italia.

Risultati. Dei 60 pazienti reclutati, 14 (23,3%) sono risultati positivi agli anticorpi anti centromero (ACA), 9 (15%) positivi agli antitopoisomerasi I e 4 pazienti (6,6%) hanno presentato positività agli anticorpi anti RNA polimerasi III. Conclusione. Nel nostro studio la frequenza di positività degli anti RNA polimerasi III anticorpale è risultata inferiore rispetto alla percentuale attesa nei pazienti italiani (stimata intorno all'11-13%), ma ciò è probabilmente in relazione alla prevalenza tra i pazienti studiati di forme di malattia limitata cutanea. Nuovi studi saranno necessari per validare il significato diagnostico e prognostico degli anti RNA polimerasi III nella pratica clinica.

Bibliografia

Tozzoli R. et al. 2007 Autoanticorpi anti-RNA polimerasi III: un nuovo test diagnostico per la sclerodermia. IJLaM; 3:269-274

147

**RUOLO DELLA CAP-INIBIZIONE NELLA DIAGNOSTICA DELL' ALLERGIA AL VELENO DI IMENOTTERI**

V. Cova<sup>1</sup>, O. Quercia<sup>2</sup>, C. Conti<sup>1</sup>, T. Manenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Unico dell'Area Vasta Romagna

<sup>2</sup>MED. interna Amb. Allergologia P.O. Faenza

Fino al 5% della popolazione in Italia e Europa mostra reazioni sistemiche a punture di imenotteri (Apis m. e Vesp. sp.) Poichè molti pazienti non riescono a individuare il tipo di imenottero, la storia clinico anamn. è poco suggestiva, inoltre i pazienti risultano polisensibili ai test cutanei anche alle massime diluizioni e le IgE sp. sono superiori alla soglia di sensibilizzazione. La Cap-inibizione è lo strumento che individua l'insetto responsabile.

Probabili cause della doppia positività in vitro:

- vera sensibilizzazione a diversi allergeni (co-sensibilizzazione)
- cross-reattività a causa delle sequenze omologhe tra allergeni provenienti da fonti diverse
- crossreattività da CCD.

Obiettivo. Paz. di 44 aa, maschio, razza caucasica con manifestazione clinica inquadrabile al grado 4 (classificazione di Mueller) per puntura di vespe alla testa. I test cutanei mostravano sensibilizzazione elevata a 0,1mcg/ml per Apis m., Vesp. sp., Vespa cr. e Pol. d. confermata da valori elevati di IgE sp. Il paziente riferiva challenge spontanei con l'Apis m. senza sintomatologia e senza identificare quale vespe l'avesse punto, abbiamo eseguito la Cap-inib. per decidere il tipo di vaccino da effettuare secondo le raccomandazioni della Position Paper EAACI 2005.

Metodologia. Sistema automatico Unicap 1000 (Phadia) con metodologia CAP FEIA per le IgE sp. e le CAP inib.

Risultati.

Omologa vesp. = 85.1%

eterologa pol.- vesp. = 35.5%

eterologa vesp.-pol. = 49.5%

omologa pol. = 82.0%

omologa vespa cr. = 73.8%

eterologa vespa cr.-pol. = 67.3%

eterologa = pol.-vespa cr. = 48.9%

omologa apis = 60.6%

Conclusioni. Esempio di come una diagnostica di secondo livello, condotta assieme al clinico specialista, sia di importanza fondamentale anche in campo allergologico.

Bibliografia

Bonifazi F et al. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice Allergy 2005 60:1459-1470).

Straumann F. Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Int Arch Immunol 2000:123:268-74.

Caruso B et al. Evaluation of IgE cross-reactions among vespid venoms. A possible approach for the choice of immunotherapy Allergy 2007;62:561-564.

148

**COMPONENT RESOLVED NELLA DIAGNOSTICA DELLE ALLERGIE ALIMENTARI**

S. Gabbriellini<sup>1</sup>, R. Berni<sup>1</sup>, L. Felet<sup>1</sup>, M.R. Metelli<sup>1</sup>, P. Pietrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate Universitaria, A.O.U.P., Pisa

Introduzione. La maggioranza degli allergeni vegetali è costituita da proteine di difesa e da proteine di accumulo espresse dalla pianta contro le infestazioni. Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nella identificazione, caratterizzazione e clonaggio degli allergeni permettendo di comprendere possibili manifestazioni di cross-reattività all'interno della stessa famiglia e migliorando diagnosi di alcune allergie alimentari, in particolare per alcuni tipi di frutta.

Studio. Si propone di individuare il profilo di sensibilizzazione del paziente, arrivando all'identificazione del tipo di proteine a cui è sensibilizzato migliorandone la gestione clinica.

Pazienti e Metodi. Lo studio ha previsto il dosaggio di IgE specifiche su siero di 9 pazienti. Il metodo utilizzato è l'Immunocap® (Phadia) Specific IgE. Il sistema diagnostico in vitro misura i livelli ematici delle IgE allergene-specifiche presenti nel siero o nel plasma umano. Il test è strutturato come un immunodosaggio FEIA "sandwich".

Risultati e Discussione. I livelli di IgE specifiche dei pazienti mostrano un'elevata positività per mela (f49), pesca (f95) e in alcuni casi anche per l'albicocca (f237). Il dosaggio dei ricombinanti ha evidenziato una marcata positività nel 78% dei pazienti per rPru p3(f420) mentre nei rimanenti pazienti la positività riguarda rPru p1 (f419). In relazione ai nostri dati e con il supporto della clinica, si può asserire che alcuni panallergeni come rPru p1, sono capaci di dare solo reazioni locali, mentre allergeni stabili al calore e resistenti alla digestione gastrica come rPru p3 inducono prevalentemente reazioni sistemiche. I nostri risultati mettono inoltre in evidenza incrementi proporzionali tra livelli di IgE specifiche per mela, pesca ed albicocca con i livelli di rPru p3. La diagnostica delle allergie per mezzo dei ricombinanti è diventata sempre più affidabile e può essere considerata un valido ausilio sia per inquadrare le allergie come un processo di sensibilizzazione verso un gruppo di allergeni con funzioni biochimiche definite, sia per impostare una dieta alimentare corretta.

Bibliografia

Asero L et al. IgE mediated food allergy diagnostic: Current status and new perspectives Mol Nutr Food Res 2007;51:135-47.

149

### MALATTIA CELIACA E METABOLISMO OSSEO: REPORT DI UN CASO DI GRAVE OSTEOPENIA IN ETA' PEDIATRICA

F. Zunino<sup>1</sup>, M. Ruggeri<sup>2</sup>, M.d.C. Baigorria Vaca<sup>1</sup>, S. Curti<sup>2</sup>, M.G. Alessio<sup>1</sup>, C. Ottomano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

<sup>2</sup>UO Pediatria, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

Introduzione. La MC ha espressione polimorfa; il quadro del bambino con diarrea e addome globoso è raro e ha lasciato il posto a quadri clinici atipici, con manifestazioni a carico di vari organi e apparati. Presentiamo un raro caso di celiachia pediatrica associata a grave osteopenia.

Caso clinico. P.S. mesi 29, crescita regolare fino al primo anno di vita, poi rallentamento della curva di crescita (25°C), nulla in anamnesi. Dicembre 2008: calo ponderale di 1.5 kg associato a zoppia dell'arto inferiore sx, con progressivo rifiuto della deambulazione. Gennaio 2009: ricovero per coxalgia sx ingravescente. Valutazione ortopedica nella norma. In seguito a comparsa di dolore addominale esegue indagini strumentali: sospetta invaginazione intestinale. Trasferimento presso l'U.O. di Chirurgia Pediatrica degli OORR di Bergamo per laparoscopia diagnostica: doppia invaginazione tenue-tenuale, laparotomia con svaginazione manuale. Post operatorio nella norma ma persistenza della coxalgia, per cui ripeteva valutazione ortopedica. RX ed RM bacino e femori: diffusa demineralizzazione ossea associata a micro fratture da insufficienza; trasferita presso U.O. di Pediatria per accertamenti. All'ingresso peso < 5° centile, algia ed impotenza funzionale degli arti inferiori. Esami nella norma, ad eccezione di anemia microcitica, ipoferritinemia e VES. Viene eseguito screening per MC con riscontro di intensa positività per anticorpi anti transglutaminasi e anti endomisio in soggetto HLA suscettibile. La biopsia duodenale confermava la diagnosi di MC e la paziente iniziava dieta aglutinata associata a terapia di supporto, con risoluzione dei sintomi

Conclusioni. Le lesioni a carico dell'osso sono frequenti nei celiaci diagnosticati in età adulta; nei bambini, sebbene al momento della diagnosi sia frequente il riscontro di riduzione della densità ossea, quadri di grave osteopenia quale quello descritto sono alquanto rari. Il malassorbimento di calcio e vitamina D costituiscono la causa principale del danno osseo nella celiachia, ma le differenze di espressione del danno nei diversi pazienti restano da chiarire.

#### Bibliografia

Stazi AV, Trecca A, Trinti V. Osteoporosis in celiac disease and in endocrine and reproductive disorders. *World J Gastroenterol* 2008;14:498-505.

150

### MALATTIA CELIACA: SIEROLOGIA E GENETICA A CONFRONTO NELLA POPOLAZIONE MARCHIGIANA

C. Venturini<sup>1</sup>, L. Marinelli<sup>1</sup>, F. Pigliapoco<sup>2</sup>, F. Bordicchia<sup>1</sup>, A. Calcinari<sup>1</sup>, C. Lambertucci<sup>1</sup>, S. Bartolucci<sup>2</sup>, S. Pierpaoli<sup>1</sup>, S. Francescangeli<sup>1</sup>, M. Tocchini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Ospedale G. Salesi, Azienda Ospedali Riuniti di Ancona

<sup>2</sup>Lab. di Genetica, Ospedale G. Salesi, Azienda Ospedali Riuniti di Ancona

La malattia celiachia (MC) è una condizione clinica che si manifesta con intolleranza al glutine in soggetti geneticamente predisposti, creando un danno alla mucosa dell'intestino tenue. Ciò causa malassorbimento con sintomi tipici, atipici, extraintestinali o del tutto silenti. La MC ha una frequenza di 1/100 con un rapporto F/M di 2:1, ma è ancora poco diagnosticata. È una patologia multifattoriale in cui il ruolo genetico viene svolto da meccanismi immunologici associati ad antigeni HLA DQ2 e DQ8. I test da usare per la diagnosi sono markers anticorpali, screening genetico e biopsia intestinale. Scopo del lavoro è raffrontare sierologia e test genetici nella popolazione marchigiana dal 2006 al 2009, valutando l'incidenza della patologia per età e per sesso. Lo studio riguarda 5000 pazienti sintomatici per MC. Sono stati dosati con metodo FEIA e IFI rispettivamente gli anticorpi AGA IgA/G, TTG IgA/G ed EMA. Solo nei casi richiesti dagli specialisti è stato eseguito anche il test genetico. Sono risultati positivi agli anticorpi TTG IgA ed EMA 207 pazienti (4.1%) con una media di 51.7 nuovi casi/anno, di cui i pediatrici sono 121 (58%), quelli in età adulta 86 (42%). La distribuzione tra i sessi comprende 140 F (67%) e 67 M (32%). Dei 305 test genetici 97 (32%) sono risultati non predisposti e, tranne una paziente, negativi anche alla sierologia. I predisposti sono 208 (68%) e di questi 105 (50%) sono risultati positivi anche alla sierologia. Dei 106 soggetti celiaci ai quali è stato eseguito anche il test genetico il 90% risulta DQ2, il 6% DQ8, il 4% DQ2-DQ8 e solo uno non presenta gli aplotipi di predisposizione. Considerando che gli individui testati appartengono ad una popolazione selezionata risulta alta l'incidenza (4,1%) di soggetti celiaci diagnosticati nelle Marche; viene confermato il rapporto di 2:1 F/M, mentre si evidenzia un incremento triplicato (da 10 a 32) negli anni di soggetti adulti celiaci. In conclusione l'incremento di nuovi casi, soprattutto in età adulta, evidenzia una maggiore attenzione da parte dei medici nel valutare la sintomatologia e sottoporre il paziente ai test specifici e conferma il valore predittivo negativo del test genetico HLA DQ.

#### Bibliografia

Tonutti E. La Diagnosi di Celiachia: non solo anti-transglutaminasi. *RIMeL/IJLaM2008;4 (Suppl.)*

151

**CYTOKINE EXPRESSION PROFILE OF SELECTED CELL POPULATIONS FROM PATIENTS WITH CHRONIC GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE AFTER ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION WITH REDUCED CONDITIONING**

M. Emanuelli<sup>1</sup>, A. Poloni<sup>2</sup>, V. Pozzi<sup>1</sup>, D. Sartini<sup>1</sup>, S. Trappolini<sup>2</sup>, S. Mancini<sup>2</sup>, B. Costantini<sup>2</sup>, F. Serrani<sup>2</sup>, E. Berardinelli<sup>2</sup>, A. Olivieri<sup>3</sup>, P. Leoni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biochimica, Biologia e Genetica, Università Politecnica Marche, Ancona

<sup>2</sup>Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, Clinica Ematologia, Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>3</sup>U.O. di Ematologia, Azienda Osp. San Carlo, Potenza

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is the most frequent long-term complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), occurring in 20% to 70% of the subjects surviving more than 100 days. It represents the major cause of late death in this group of patients, and in survivors it is often associated with severe impairment of quality of life<sup>1</sup>. This study investigated the role of inflammatory cytokines on cGVHD incidence, in patients who received a reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic HSCT.

15 patients, who had received HSCT for malignant hematologic disorders, were studied. Seven patients had cGVHD, whereas 8 did not developed GVHD during the period of observation after HSCT. We first analyzed the expression profiles of 114 cytokines in CD3+ and CD14+ immunoselected cell populations from cGVHD and control samples. In CD3+ cell population 19 genes showed a statistically significant difference in expression between cGVHD and control samples, being 11 genes upregulated in patients with cGVHD. In CD14+ cell population the expression of 15 genes was significantly different between the two groups, being 9 genes up-regulated in the cGVHD group.

To better investigate and to confirm the results detected by macroarray analysis, 11 cytokines were selected for further evaluation by Real-Time quantitative PCR analysis. Total RNA was isolated from CD4+, CD8+ and CD14+ cell populations of 7 patients with cGVHD and 8 controls and analyzed by Real-Time quantitative PCR. Differential gene expression measurements (cGVHD vs control) showed a significant down-regulation of TNFSF12 (0.34-fold) and PDGFB (0.20-fold) in CD4+ and of TNFSF10 (0.54-fold) in CD8+ cell population. A significant increase of INF $\gamma$  (3.56-fold) was detected in CD8+, while LTB (3.66-fold) and TNFSF10 (1.59-fold) appeared overexpressed in CD14+ cell population ( $p < 0.05$ ). These data suggest that different immune populations can play a role in the cGVHD pathogenesis and the early detection of gene expression profile in these patients could offer the chance to test new molecular approaches, aimed to interfere with the specific intracellular pathway deregulation observed in these patients.

**Reference**

1. Pérez-Simón JA et al. Br J Haematol 2005;130:394-403.

152

**DIAGNOSTICA DELLE CONNETTIVITI: STESURA E APPLICAZIONE IN UN CONTESTO CLINICO-LABORATORISTICO DI UN PROTOCOLLO OPERATIVO FINALIZZATO ALL'APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA**

C. Bonaguri<sup>1</sup>, A. Melegari<sup>2</sup>, A. Ballabio<sup>3</sup>, P. Terenziani<sup>4</sup>, A. Russo<sup>1</sup>, L. Battistelli<sup>1</sup>, R. Aloe<sup>7</sup>, E. Bonilauri<sup>1</sup>, G. Tsamplakos<sup>5</sup>, A. Romero Alvarez<sup>1</sup>, M.T. Marino<sup>1</sup>, P.P. Dall'Aglio<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Lab. Diagnostica Ematochimica, Dip. Patol. e Medicina di Lab, Azienda Osp-Univ. Parma

<sup>2</sup>Lab. Analisi Chimico-Clin, Azienda Osp.Univ. Policlinico Modena

<sup>3</sup>Lab. Analisi P.O. Castel San Giovanni, AUSL Piacenza

<sup>4</sup>Lab. Microbiologia, ASMN Reggio-Emilia

<sup>5</sup>Servizio Informativo Aziendale, Dip. Tecnico e delle Tecnologie, Azienda Osp-Univ. Parma

<sup>6</sup>Clin. Immunol. Medica, Azienda Osp.Univ. Parma

<sup>7</sup>S.S.Dip. Biochimica elevata Automazione, Dip. Patol. e Medicina di Lab, Azienda Osp-Univ. Parma

Scopo. Nella diagnostica delle Connettiviti uno dei criteri è il rilievo di specifici autoanticorpi, anti-nucleo (ANA), anti-DNA a doppia elica (dsDNA) e anti-antigeni nucleari estraibili (ENA). Il costante incremento che si registra in tali richieste rende di particolare interesse promuovere interventi di appropriatezza prescrittiva. Obiettivo dello studio è stato definire e applicare ai pazienti ospedalizzati presso le Aziende Sanitarie dell'Area Vasta Nord-Occidentale dell'Emilia-Romagna (Parma, Reggio-Emilia, Modena e Piacenza) uno specifico algoritmo diagnostico.

Metodologia. La ricerca, attivata dal Gennaio 2008 e finanziata con fondi regionali, è finalizzata ad una esecuzione mirata e sequenziale dei tests, come suggerito da Linee Guida, utilizzando il test ANA (positività e titolo) come criterio decisionale per l'esecuzione di tests di approfondimento (dsDNA ed ENA). Il progetto ha previsto la costituzione di un Gruppo di lavoro multidisciplinare inter-aziendale che, acquisiti i dati di produzione, le metodiche utilizzate e le modalità di refertazione, ha redatto un protocollo per l'adozione di un algoritmo comune, reso effettivo dalle Direzioni Aziendali dal Gennaio 2009. L'efficacia economico/gestionale e la specificità diagnostica verranno valutati confrontando sia le statistiche di produzione che i risultati dei tests eseguiti nel periodo antecedente e seguente l'applicazione del protocollo.

Risultati. Al momento sono state elaborate le statistiche e i risultati del primo semestre 2008. I pazienti valutati per la sierologia delle Connettiviti sono stati 16.184. Relativamente ai pazienti ospedalizzati, i tests effettuati (numero e % di positività) sono stati: ANA:7.571 (28.8% pos), ENA:2.672 (13.4% pos) e dsDNA:2.697 (11.0% pos).

Conclusioni. Auspichiamo che il protocollo da noi proposto e applicato in un'Area vasta possa contribuire a migliorare i percorsi assistenziali delle Connettiviti sia in termini di efficienza economica/gestionale (decremento dei tests richiesti) sia di specificità diagnostica (incremento delle % di positività ai tests di approfondimento).

153

### DIGESTIVE SCREENING: NUOVO KIT ELISA MULTIPARAMETRICO PER PAZIENTI CON SINTOMATOLOGIA GASTROINTESTINALE CORRELATA ALLE REAZIONI AVVERSE AGLI ALIMENTI (RAA)

C. Battista<sup>1</sup>, G. Demarin<sup>1</sup>, E. Lauzzana<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. Ricerca e Sviluppo, Bio Genetix, Trieste

Il notevole interesse verso le Reazioni Avverse agli Alimenti (RAA) ha portato sul mercato diversi kit, spesso senza validazione scientifica, sollevando controversie sulla loro efficacia diagnostica. La sezione R&D della BIO GENETIX sta mettendo a punto il Digestive Screening, ovvero uno screening multiparametrico, per pazienti con sintomatologia intestinale correlata alle RAA, per il dosaggio simultaneo di IgEs e IgG4s per un pannello di 37 alimenti, e delle IgA anti-tTG, evidenziando, in caso di positività una risposta immunologica per gli alimenti in esso contenuti, oppure escludendola in caso di negatività. Abbiamo unificato tre metodologie ELISA, IgEs e IgG4s per i 37 principali allergeni alimentari della nostra dieta, utilizzando 10 miscele, e le IgA anti-tTG; per ogni paziente l'ENEASYSTEM esegue complessivamente 21 test per un totale di 75 parametri (37 IgEs+37 IgG4s+1 IgA anti-tTG).

Abbiamo verificato e confermato la corrispondenza tra i risultati delle 10 miscele con i risultati degli allergeni singoli utilizzando 20 sieri, a titolo noto di IgEs e IgG4s; per le IgEs è risultata >93%, per le IgG4s >96%. Per i test di ripetibilità, il CV% medio delle IgEs è risultato del 9,2% e dell'11,6% per le IgG4s.

Sono emersi anche aspetti molto suggestivi, ma necessari di futuri approfondimenti: quando le IgEs sono positive, le IgG4s sono spesso negative, e viceversa; con le IgA anti-tTG positive, le IgE sono negative, mentre le IgG4 sono spesso positive a latte, uova e cereali. Da questo approccio iniziale il Digestive Screening di BIO GENETIX risulta essere un kit comodo da utilizzare, con interessanti applicazioni cliniche, che, se pur da approfondire con casistiche più ampie, evidenzia fin da ora una affidabilità superiore a molti altri test applicati alle RAA, in grado di supportarne più efficacemente lo studio, evidenziando una risposta anticorpale se il test è positivo, o escludendola, in caso di negatività.

#### Bibliografia

1. Bernardi D et al. Time to reconsider the clinical value of immunoglobulin G4 to foods? Clin Chem Lab Med 2008.
2. AAAI Executive Committee. The use of in vitro tests for IgE antibody in the specific diagnosis of IgE-mediated disorders and in the formulation of allergen immunotherapy. Allergy Clin Imm 1992.

154

### INTERLEUKIN 8 AND MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 LEVELS IN SERA FROM AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTS

M.R. Metelli<sup>1</sup>, P. Bongioanni<sup>2</sup>, F. Fulceri<sup>1</sup>, F. Manzone<sup>1</sup>, M.C. Tuccio<sup>2</sup>, S. Giunti<sup>1</sup>, B. Rossi<sup>2</sup>, P. Pietrini<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. of Clinical Biochemistry, Dep. of Experimental Pathology, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, University of Pisa, Italy<sup>2</sup>Neurorehabilitation Unit, Dept. of Neuroscience, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, University of Pisa, Italy

**Aim of the study.** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease with progressive cell death of upper and lower motor neurons. Derangements of the immune function have been implicated in ALS pathogenesis and pathophysiology. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) are involved in inflammatory cell recruitment and function in diseased central nervous system. The aim of our study was to assay IL-8 and MCP-1 levels in ALS patients sera overtime.

**Subjects and methods.** Twenty-seven ALS patients (15 men and 12 women) were studied. Disease severity was scored by means of the ALS Functional Rating Scale, and patients subgrouped accordingly into 3 classes: I (scoring between 40 and 31); II (from 30 to 11); and III (between 10 and 0). IL-8 and MCP-1 concentrations were measured, repeatedly over a two-year period, by an enzyme-linked immunosorbent assay. IL-8 and MCP-1 data refer to assays at time of the first visit ( $T_0$ ) and those at time of the most recent clinical examination ( $T_n$ ).

**Results.** Mean IL-8 levels were significantly ( $p < 0.05$ ) lower at  $T_n$  vs  $T_0$  ( $0.9 \pm 0.6$  vs  $3.8 \pm 4.8$  pg/ml) only in class II patients remaining in such a class, therefore not progressing overtime. On the other hand, mean MCP-1 levels were higher, in both class II and class III patients, at  $T_n$  vs  $T_0$ ; moreover, ALS patients shifting from class II to class III, namely worsening overtime, showed significantly ( $p < 0.01$ ) increased mean MCP-1 values at  $T_n$  vs  $T_0$  ( $475 \pm 212$  vs  $339 \pm 175$  pg/ml).

**Discussion.** Our data support the hypothesis that MCP-1 can be regarded as a marker of disease progression, since MCP-1 amounts increased overtime in sera from rapidly progressing ALS patients, thus paralleling the clinical worsening. Our findings on IL-8 serum levels are somehow weaker, but they seem to suggest a relationship between low mean IL-8 values and clinical stability, as if also IL-8 values in ALS patients' sera were related to disease progression. However, the number of patients studied needs to be increased to achieve more reliable and definitive conclusions.

#### Reference

1. Kuhle et al. Eur J Neurol 2009;16:771-4.

155

### LE IgE CONTRO GLI ALLERGENI RICOMBINANTI POSSONO AIUTARE LA GESTIONE DEL PAZIENTE ALLERGICO

L. Caponi<sup>1</sup>, I. Del Corso<sup>2</sup>, P. Paganucci<sup>2</sup>, V. Rocchi<sup>2</sup>, P. Migliorini<sup>2</sup>, P. Pietrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Lab. di Analisi Specializzate, Dip. Medicina di Laboratorio e Diagnostica Molecolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

<sup>2</sup>S.A Allergologia e Immunologia Clinica, Dip. Medicina Interna, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

Per migliorare la gestione dei pazienti (pt) con allergia alimentare, tra gli afferenti all'ambulatorio di Allergologia, sono stati selezionati 17 pt consecutivi che riferivano Sintrome Orale Allergica (SOA), orticaria o anafilassi dopo ingestione di frutti della famiglia delle Rosacee, allergia alimentare tra le più comuni. È noto che alcuni tra questi pt sono anche allergici ai pollini. Mediante metodica UniCAP (Phadia) abbiamo ricercato IgE sieriche dirette verso allergeni ricombinanti corrispondenti ai maggiori allergeni della pesca, Pru p1 (PR-10), Pru p3 (LTP) e Pru p4 (profilina). I risultati sono stati confrontati con i sintomi e con i risultati dei test cutanei (skin prick test, SPT).

Nove pt avevano manifestato una SOA, 3 orticaria, e 5 una reazione anafilattica lieve. Tutti i pt tranne due dimostravano test cutanei positivi per alimenti delle Rosacee. Dodici su 17 pt avevano una positività per IgE dirette contro la LTP (> 0.1 kUA/l); di questi, 3 presentavano anche IgE dirette verso le profiline e 2 anche per la PR-10. Due pt avevano IgE specifiche solo per la PR-10 e due non presentavano IgE specifiche per alcuno dei tre allergeni ricombinanti. I 5 pt con anafilassi, e 2 pt su 3 con orticaria avevano IgE dirette contro la LTP. Da notare che anche 6 su 9 pt con SOA avevano IgE dirette verso la LTP. Tutti i 4 pt con IgE dirette verso la PR-10 presentavano SPT positivi per Rosacee e per betulla, dato comune in pt con allergia ad alimenti e inalanti. Tra i 16 pt con SPT per betulla, i 7 con SPT positivo avevano anche o solamente IgE dirette verso profilina e/o PR-10. Dei 9 pt con SPT negativo per betulla, 6 avevano IgE anti-LTP indicante una allergia primaria all'alimento. Dei tre pt sintomatici, ma sierologicamente negativi, 2 avevano sia SPT per betulla che per alimenti negativi e questo fa pensare a reazioni non allergiche.

I nostri dati confermano che nel caso di allergia primaria verso l'alimento le IgE sono dirette principalmente verso la LTP, mentre se coesiste allergia a polline sono presenti IgE dirette verso allergeni più condivisi (PR-10, profilina). Non abbiamo osservato corrispondenza tra la presenza o il livello di specifiche IgE e gravità della clinica.

#### Bibliografia

Steckelbroeck S et al. J Allergy Clin Immunol 2008;121:1323.

156

### PANCREATIC CANCER (PC) ALTERS HUMAN CD4+ T LYMPHOCYTE FUNCTION: A PIECE OF THE IMMUNEVASION PUZZLE

E. Fadi<sup>1</sup>, P. Fogar<sup>2</sup>, G. Pantano<sup>1</sup>, A. Padoan<sup>1</sup>, D. Bozzato<sup>1</sup>, M. Facco<sup>3</sup>, M.C. Sanzari<sup>4</sup>, S. Teolato<sup>3</sup>, G. Semenzato<sup>3</sup>, S. Pedrazzoli<sup>2</sup>, D. Basso<sup>4</sup>, M. Plebani<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies, University of Padova

<sup>2</sup>Dept. of Medical and Surgical Sciences, University of Padova

<sup>3</sup>Dept. of Clinical and Experimental Medicine, University of Padova

<sup>4</sup>Dept. of Laboratory Medicine, University of Padova

<sup>5</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies and Dept. of Laboratory Medicine, University of Padova

Background. Tumors might evade immunesurveillance by impairing CD4+ T cells function. We compared the effects of PC and other gastrointestinal cancer (GIC) cells on 1. CD4+ T cells proliferation, migration and differentiation, 2. expansion of CD4+ memory (CD45RO), naive (CD45RA), activated (CD69) and regulatory (CD25) subsets.

Methods. CD4+ T cells, from 29 blood donors, were cultured for 4 days in control or pancreatic (BxPC3, Capan1, MiaPaCa2), colorectal (HT29), gastric (AGS) or hepatocellular (HepG2) cancer cell conditioned media (CM).

To assess migration a transwell system with or without hSDF $\alpha$  was used; migrating cells were estimated by a luminescent assay. Cell proliferation, with or without allogeneic PBMC, was evaluated after 72 hrs (<sup>3</sup>H-Thymidine incorporation). Before and after 4 culture days we evaluated IFN $\gamma$  production (ELISA) and CD45RA, CD45RO, CD69 and CD25 membrane expression (FACS) in control and conditioned CD4+ T cells.

Results. PC cells, differently from other GIC cells, inhibit CD4+ T cell proliferation both in the presence and absence of PBMC (p<0.001). Under hSDF $\alpha$  chemotaxis only PC cell CM significantly reduced lymphocyte migration with respect to control (p<0.001). All PC CM significantly induced CD4+ T cell IFN $\gamma$  production (p<0.05) with respect to control or other GIC CM (p:ns). Control or tumor CM did not modify CD45RA, CD45RO or CD25 subsets. CD69 positive cells were significantly expanded by PC (p<0.001) but not by other GIC cell CM.

Conclusions. These "in vitro" findings support the hypothesis that PC might evade immunesurveillance by altering CD4+ T lymphocytes.

#### Reference

1. Clark CE et al. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. Cancer Res 2007;67:9518-27.

157

### COMPARATIVE EVALUATION OF 2-DE IMMUNOLOGICAL PROFILES OF ALLERGIC PATIENTS SENSITIZED TO LOLIUM PERENNE POLLEN

M. De Canio<sup>1</sup>, S. D'Aguanno<sup>2</sup>, C. Sacchetti<sup>1</sup>, F. Petrucci<sup>3</sup>, S. Bernardini<sup>1</sup>, A. Urbani<sup>2</sup>, G. Cavagni<sup>4</sup>, G. Federici<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Interna, Università di Roma "Tor Vergata"

<sup>2</sup>CERC-Fondazione Santa Lucia-IRCCS, Roma

<sup>3</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio" di Chieti e Pescara

<sup>4</sup>Osp. Pediatrico Bambino Gesù-IRCCS, Roma

Pollens are the most frequent cause of seasonal allergic rhinitis affecting about 15% of European population. Their allergenicity is linked to a limited number of proteins released from hydrated pollen grains upon contact with nasal mucosa or conjunctiva surfaces. These proteins are readily recognized by IgE antibodies which trigger a type I immune response relied on the activation of basophils and tissue mast cells. The consequent release of immunological and inflammatory mediators, such as histamine, cytokines, leukotrienes, is responsible for allergic symptoms elicitation. In the last years, proteomics provided powerful tools to investigate biochemical and immunological properties of these allergy-eliciting proteins. We previously reported the mass spectrometry identification of allergen components of *Lolium perenne* (ryegrass) pollen. Here, we pursued the proteomic approach to define and compare the particular IgE profiles of 19 patients sensitized to ryegrass pollen.

Immunological profile of each patients was obtained by 2-DE separation of a ryegrass pollen extract, transfer on nitrocellulose membrane, incubation with patient serum sample followed by chemiluminescent detection of IgE-recognized components. Spot immunoreactivities were evaluated by ImageMaster analysis software and expressed as intensity percentage. These data were processed by Spearman rank correlation analysis and employed to create a qualitative matrix designed on presence/absence of each allergen in all the immunoblots. Hierarchical clustering analysis by PermutMatrix allowed a classification of patient profiles into 3 classes. Mann-Whitney U-test revealed that patients showing more complex 2-DE immunoblot pattern have increased levels of serum IgE and a higher susceptibility to multiple sensitization. Significantly all these patients are sensitized to profilin, considered the main cross-reactive allergen in grass pollen.

#### Reference

De Canio M, D'Aguanno S, Sacchetti C, et al. Novel IgE Recognized Components of *Lolium perenne* Pollen Extract: Comparative Proteomics Evaluation of Allergic Patients Sensitization Profiles. *J Proteome Res.* 2009 Jul 8. [Epub ahead of print]

158

### SIGNIFICATO DEGLI ANTICORPI ANTI VIMENTINA MUTATA CITRULLINATA (MCV) NELLE MALATTIE REUMATICHE DEL BAMBINO

D. Faggian<sup>1</sup>, M. Pittoni<sup>1</sup>, S. Chiappin<sup>1</sup>, M. Celadin<sup>1</sup>, V. De Riva<sup>1</sup>, F. Biscaro<sup>2</sup>, F. Vittadello<sup>2</sup>, F. Zulian<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

Introduzione. Gli anticorpi anti vimentina mutata citrullinata (MCV) appartengono alla famiglia degli autoanticorpi reattivi verso le proteine citrullinate e sembrano identificare un sottogruppo di pazienti con Artrite Reumatoide precoce destinati ad una malattia aggressiva e distruttiva.

Scopo. valutare la prevalenza e il significato clinico degli anti MCV in un gruppo di pazienti pediatrici con malattie reumatiche.

Metodi. 92 pazienti con Artrite Idiopatica Giovanile (AIG), 20 Connettiviti (14 Dermatomiostite (DMG) e 6 Lupus Eritematoso Sistemico (LES), 17 Vasculiti (15 con malattia di Kawasaki e 2 con panarterite nodosa (PAN), ad esordio pediatrico (< 16 anni) sono stati valutati clinicamente e definiti in fase attiva o inattiva in base a criteri standardizzati. Al momento della valutazione clinica sono stati eseguiti Emocromo, VES, Proteina C reattiva, ANA e Fattore Reumatoide. Sono stati dosati con metodo ELISA gli anticorpi anti CCP (anti-CCP2, Axis-Shield) e anti MCV (Anti-MCV, Orgentec Diagnostika). I risultati ottenuti sono stati comparati con quelli di 32 bambini sani.

Risultati. Valori positivi per anti MCV sono stati rilevati nel 53% dei pazienti con AIG, 76% di quelli con vasculiti e 40% delle connettiviti. Valori anti CCP positivi sono stati rilevati solo in un paziente con AIG poliarticolare e uno con AIG sistemica. L'analisi statistica ha dimostrato una significativa correlazione tra anticorpi anti MCV e attività di malattia, VES e PCR nella AIG e nelle Vasculiti ( $p < 0.05$ ). Non sono state trovate correlazioni tra anticorpi anti MCV e FR, ANA e anti CCP in nessuna delle patologie considerate. I soggetti sani di controllo sono tutti risultati negativi sia per gli anticorpi anti CCP che per anti MCV.

Conclusioni. Gli anti MCV sono presenti con alta prevalenza nelle principali malattie reumatiche ad esordio pediatrico. In particolare nelle AIG e nelle Vasculiti sembrano correlare con l'attività di malattia. Resta da verificare se, come nell'adulto, possano avere un significato predittivo per l'esordio o l'aggressività di queste patologie.

#### Bibliografia

Keskin G. et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-modified citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis. *Prot and Pept lett* 2008;15:314-317.

159

**IL DOSAGGIO DELL'HCG IN CHEMILUMINESCENZA SU ARCHITECT ED IMMULITE 2000. NOSTRA ESPERIENZA**

R. Lovero<sup>1</sup>, M. Pepe<sup>1</sup>, I. Carbonara<sup>2</sup>, A. Legrottaglie<sup>1</sup>, F. Epicoco<sup>1</sup>, S. Tundo<sup>1</sup>, F. Ghezzani<sup>1</sup>, C. Saracino<sup>1</sup>, A. Carucci<sup>1</sup>, E. Vinci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. C. Lab. di Analisi Fasano Ostuni Cisternino (BR)

<sup>2</sup>U.O. Ginecologia Ostetricia Ospedale Fasano (BR)

La gonadotropina corionica umana (HCG) è un ormone glicoproteico normalmente presente nel sangue e nell'urina delle donne durante la gravidanza. Viene secreto dal tessuto placentale quasi subito dopo l'impianto e serve a sostenere il corpo luteo durante le prime settimane di gravidanza.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare la correlazione tra due analizzatori che utilizzano la metodica in chemiluminescenza per il dosaggio dell'HCG su siero di donne gravide.

Materiali e Metodi. Sono stati selezionati 20 campioni di siero di donne gravide rispettivamente ad una, due, tre e quattro settimane di amenorrea. Inoltre, come controllo negativo abbiamo utilizzato un pool di 50 sieri con valore di HCG pari a zero; come controllo positivo abbiamo utilizzato un pool di sieri che erano risultati positivi per il dosaggio dell'HCG. Tutti i campioni sono stati analizzati simultaneamente sia su Architect che su Immulite. I risultati sono stati espressi come coefficiente di Pearson; i valori con  $p < 0.05$  sono stati considerati significativi.

Risultati. Per l'Architet il CV intraserie è stato di 0,87% mentre tra serie è stato di 1,68%; per l'Immulite il CV intraserie è stato di 0,92% mentre tra serie è stato di 1,75%. I sieri delle donne gravide analizzati su entrambi gli strumenti hanno mostrato la seguente correlazione: ad una settimana di amenorrea  $r=0,88$  ( $p<0.001$ ), a due settimane di amenorrea  $r=0,92$  ( $p<0.001$ ), a tre settimane di amenorrea  $r=0,77$  ( $p<0.001$ ), a quattro settimane di amenorrea  $r=0,62$  ( $p<0.001$ ).

Conclusioni. Dai dati raccolti appare evidente che i due analizzatori correlano perfettamente pertanto questo ci consente di utilizzare indifferentemente i due analizzatori. Inoltre presentano un CV al di sotto dei limiti consigliati dalla letteratura per i dosaggi in chemiluminescenza.

Bibliografia

Kosasa TS. Measurement of human chorionic gonadotropin. *J Reprod Med* 1981;26:201-6.

160

**MARKERS DI METABOLISMO OSSEO NEI PAZIENTI EMO-DIALIZZATI**

F. Balboni<sup>1</sup>, B. Morrocchi<sup>1</sup>, D. Veggi<sup>1</sup>, M. Gallo<sup>3</sup>, D. Sacchi<sup>3</sup>, G. Monzani<sup>3</sup>, P. Tozzi<sup>2</sup>, F. Pirollo<sup>2</sup>, D. Giovannini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, IFCA, Firenze

<sup>2</sup>Lab. Generale, Dip. Diagnostica di Lab., Az. Osp. Univ. CAREGGI, Firenze

<sup>3</sup>Centro Dialisi Ulivella, IFCA, Firenze

Una delle conseguenze dell'Insufficienza Renale Cronica avanzata è la perdita della capacità di regolare correttamente l'omeostasi fosfo-calcica. Il dosaggio del PTH rientra nella prassi consolidata e consigliata dalle linee guida. Nei pazienti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) i livelli di Vitamina D sono più bassi della norma, con conseguente alterazione del metabolismo fosfo-calcico. Il dosaggio della Vitamina D, in corso di IRC, consente un'adeguata correzione terapeutica. L'isoforma ossea della Fosfatasi Alcalina (BAP), fornisce un utile supporto nel monitoraggio della terapia con farmaci che tendono a controllare l'asse calcio-fosforo-Paratormone, in particolare nell'iperparatiroidismo secondario e nell'osteodistrofia renale che caratterizzano gran parte dei pazienti affetti da IRC.

Scopo del lavoro è stato quello di evidenziare nei pazienti emodializzati eventuali correlazioni tra questi tre importanti markers del metabolismo osseo.

58 campioni di siero e plasma provenienti da pazienti emodializzati omogenei per età e per sesso (21 F; 37 M) sono stati analizzati su DiaSorin LIAISON® con i kit LIAISON® BAP OSTASE®, LIAISON® N-tact™ PTH e LIAISON® 25OH-VITAMIN\_D TOTAL (che dosa entrambe le isoforme D2 e D3 della 25OHVitaminaD).

I risultati relativi al dosaggio della Vitamina D mostrano, come atteso dai dati riportati in letteratura, una carenza nel 68% dei pazienti, ed un'insufficienza nel restante 32%, malgrado la quasi totalità di essi siano sottoposti a regolare supplementazione con Calcitriolo o Paracalcitolo. I risultati del dosaggio del PTH mostrano un iperparatiroidismo secondario presente in tutti i pazienti in uremia terminale in trattamento con Vitamina D o analoghi. I risultati del dosaggio della BAP mostrano il buon controllo del metabolismo osseo come conseguenza di una corretta gestione clinica del paziente.

L'utilizzo combinato dei dosaggi di questi tre markers di metabolismo osseo permette una corretta gestione del paziente in emodialisi in accordo con le linee guida internazionali.

Utilizzo della vitamina D e analoghi, dei chelanti del fosforo e dei calciomimetici nella terapia dell'iperparatiroidismo secondario e della patologia ossea nelle nefropatie croniche: linee guida - SIN 2007

161

### VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DELL'INFEZIONE DA TOXOPLASMA, CITOMEGALOVIRUS, ROSOLIA E HERPES VIRUS UN UNA POPOLAZIONE SELEZIONATA DI GRAVIDE DELLA ASL BARI – (BARI – PUGLIA)

R. Scarcella<sup>1</sup>, G. Brancaccio<sup>1</sup>, V. Mezzina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Analisi Cliniche e Microbiologiche P.O. San Paolo, ASL Bari, Bari

Introduzione. Le infezioni virali in gravidanza, come è noto, rappresentano un grave rischio per il nascituro in quanto responsabili di gravi difetti congeniti, pertanto per ogni gravidanza viene eseguito uno screening per i quattro virus la cui sigla è normalmente conosciuta come TORCH. Nel presente lavoro si è valutata l'incidenza delle infezioni TORCH in un gruppo selezionato di gravide nella provincia di Bari.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati i risultati del TORCH di 158 donne gravide che afferivano al reparto di Ginecologia e Ostetricia dell'ospedale San Paolo di Bari, nel periodo compreso fra marzo e giugno 2009.

Il pannello esami sottoposto a valutazione comprendeva i test per la Toxoplasmosi IgG e IgM, la Rosolia IgG e IgM, il Citomegalovirus IgG e IgM e l'Herpes virus 1 IgG, e Herpes virus 2 IgG e Herpes virus IgM ½.

Risultati. La intesi dei dati è allegata alla tabella.

Pazienti totali	Pazienti Positivi	Pazienti negativi	Test Avidity
Test			

TOXO IgG	151	23(15,%)	128	(85)	3
----------	-----	----------	-----	------	---

TOXO IgM	151	4(2,6%)	147	(97,4%)	
----------	-----	---------	-----	---------	--

RUBEO IgG	93	81(87,1%)	12	(12,9%)	1
-----------	----	-----------	----	---------	---

RUBEO IgM	93	1(0,1%)	92	(99%)	
-----------	----	---------	----	-------	--

CITO IgG	109	94(86%)	15	(14,%)	1
----------	-----	---------	----	--------	---

CITO IgM	109	1(1%)	108	(99%)	
----------	-----	-------	-----	-------	--

HERPES 1 IgG	44	39(89%)	5	(11%)	
--------------	----	---------	---	-------	--

HERPES 2 IgG	44	0(0%)	44	(100%)	
--------------	----	-------	----	--------	--

HERPES 1/2IgM	44	0(0%)	44	(100%)	
---------------	----	-------	----	--------	--

Conclusione. Il campione di donne gravide analizzato nel periodo suindicato pone in evidenza una percentuale di incidenza in linea con i dati di letteratura e che rispecchiano l'andamento dell'infezione da TORCH nella provincia di Bari.

#### References

1. Lazzarotto T, Varani S, Gabrielli L, et al. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Infectology* 1999;42:390-7.

2. Lazzarotto T, Landini MP. New developments in the diagnosis of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:19-20.

162

### CLSI (NCCLS) EP17-A PROTOCOL APPLICATION ON ACCESS® AccuTnl® ASSAY ON BECKMAN COULTER UNICEL® DXI 800 ACCESS IMMUNOASSAY SYSTEM

M. Moretti<sup>1</sup>, O. Stepanko<sup>1</sup>, M.B. Rocchi<sup>2</sup>, D. Sisti<sup>2</sup>, L. Lupis<sup>3</sup>, E. Delprete<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Clin. Path., ASUR Marche ZT3 Fano (PU)

<sup>2</sup>Dept. SUAN Biomath. Univ. Urbino "Carlo Bo" Urbino (PU)

<sup>3</sup>Dept. Transf. Med. ASUR Marche ZT3 Fano (PU)

Background. In EP17-A (1), limit of Blank (LoB) is "the highest value we expect to see in a series of results on samples that contains no analyte"; limit of Detection (LoD) is "the actual concentration at which an observed test result is very likely to exceed the LoB and may therefore be declared as detected".

Access®AccuTnl® is a chemiluminescent immunoassay for cardiac troponin I (cTnl) detection. Same reagent can be used on different Beckman Coulter platforms. AccuTnl assay product insert claims analytical sensitivity at 0.01 µg/L, 10% CV at 0.06 µg/L and 99 h percentile at 0.04 µg/L. In 2007 we found on Access2 Immunoassay System minimum detectable concentration (MDC) at 0.012 µg/L (20% CV), 10% CV at 0.048µg/L and 99th percentile at 0.026µg/L (16% CV).

Aim of the study. Apply EP17-A for AccuTnl LoB and LoD identification, and compare obtained results with product insert claimed performances and our previous experiences.

Methods. LoB with six samples (S, ten double determinations in ten days): S1 and S2 standard S0 from two different calibrators lot; S3 diluent; S4, S5, S6 undetectable Tnl in serum from three different patients.

LoD with six samples derived from LoB samples, ranged from LoB to four-times LoB (ten double determinations in ten days).

Data collection: concentrations and RLUs (Relative Light Units).

LoB and LoD calculation is derived parametrically or non-parametrically as appropriate, for both concentration and RLU data.

Results. LoB samples mean concentration/RLU: S1 0.001/11022; S2 0.000/11109; S3 0.002/11411; S4 0.004/12078; S5 0.005/12153; S6 0.006/12243. LoB: 0.00605µg/L.

LoD samples mean concentration/RLU: S1 0.006/12545; S2 0.008/12877; S3 0.014/13906; S4 0.018/14373; S5 0.020/14763; S6 0.030/16271. LoD: 0.020 (non-parametric) and 0.0205µg/L (parametric).

Conclusion. EP17-A application on Access®AccuTnl® immunoassay shows results consistent with product insert claims. Access 2 and UniCel Dxl 800 gives similar performances. EP-17-A application stress a lot the evaluated assay at low end, and our results confirm AccuTnl analytical reliability, which is very important to assure troponin test clinical performances.

#### Reference

1. CLSI EP17-A Prot. for Det. of LoD and LoQ: Approved Guideline 2004.

163

**LIMITS OF DETECTION AND QUANTITATION FOR ACCESS® HYBRITECH® PSA ASSAY WITH HYBRITECH AND WHO STANDARDIZATION BY CLSI (NCCLS) EP17-A PROTOCOL APPLICATION ON BECKMAN COULTER UNICEL® DXI 800**

M. Moretti<sup>1</sup>, O. Stepanko<sup>1</sup>, M.B. Rocchi<sup>2</sup>, D. Sisti<sup>2</sup>, L. Lupis<sup>1</sup>, E. Delprete<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Clin. Path., ASUR Marche ZT3 Fano (PU)

<sup>2</sup>Dept. SUAN Biomath. Univ. Urbino "Carlo Bo" Urbino (PU)

<sup>3</sup>Dept. Transf. Med. ASUR Marche ZT3 Fano (PU)

Background. Access®Hybritech®PSA is a chemiluminescent assay for PSA (Prostate Cancer Antigen) detection. Same reagent can be used on different Beckman-Coulter platforms and can be calibrated by two standards, Hybritech (Hcal) and WHO (Wcal). Assay product insert claims different cut-off with Hcal and Wcal at 4.0 and 3.1ng/mL respectively, but same analytical and functional sensitivity, at 0.008 and 0.019ng/mL.

In EP17-A (1) Limit of Blank (LoB) is "the highest value we expect to see in a series of results on samples that contains no analyte"; limit of Detection (LoD) is "the actual concentration at which an observed test result is very likely to exceed the LoB and may therefore be declared as detected" and limit of Quantitation (LoQ) is "the actual concentration at which the analyte is reliably detected and at which the uncertainty of the observed test result is less than or equal to the goal set by the laboratory".

Aim of the Study. Determine LoB, LoD and LoQ applying EP17-A to Hybritech PSA assay Hcal and Wcal.

Methods. LoB with 6 samples (S, 10 double tests/10 days): S1 and S2 standard S0 from 2 calibrators lot; S3 diluent; S4, S5, S6 undetectable PSA in serum from 3 patients.

LoD with 6 S derived from LoB S, ranged from LoB to 4-times LoB (10 double tests/10days).

LoB and LoD calculation is derived parametrically or non-parametrically as appropriate, for both concentration and RLU data.

LoQ goal: 10% and 20%CV corresponding concentrations by imprecision profile determination on 12 serum pools (PSA range 0.014-10.1 ng/mL). %CV was determined by hyperbolic regression fitting data (ANOVA, p<0.001).

Results. LoB: Hcal 0.0046ng/mL; Wcal 0.005ng/mL.

LoD: Hcal 0.014ng/mL; Wcal 0.015ng/mL.

LoQ 10%CV: Hcal 0.041363ng/mL; Wcal 0.034233ng/mL.

LoQ 20%CV: Hcal 0.015181ng/mL; Wcal 0.013569ng/mL.

Regression Hcal  $y=0.2398x + 4.2017$  ( $R^2=0.9515$ ); Wcal  $y=0.2248x + 3.4335$  ( $R^2=0.9596$ ).

Any statistical difference was observed neither between Hcal and Wcal nor between 10% and 20%CV.

Conclusion. EP17-A results confirm product insert claims. Optimal low end performances and minimal analytical variability assure reliability in several clinical settings.

Reference

1. CLSI EP17-A Prot.for Determ. LoD and LoQ: Approved Guideline 2004.

164

**IL PROBLEMA DEL DOSAGGIO DELLA VITAMINA D: CONFRONTO TRA METODO RIA E UN NUOVO METODO IMMUNOCHEMICO AUTOMATIZZATO**

S. Betteto<sup>1</sup>, D. Macri<sup>1</sup>, M. Macri<sup>1</sup>, G. Priolo<sup>1</sup>, G. Mengozzi<sup>1</sup>, C. Baldi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. "Baldi e Riberi", A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

Premessa. In aggiunta ai metodi RIA, HPLC e LC-TMS, per il dosaggio della 25OH-vitamina D sono stati sviluppati dosaggi immunochimici alternativi automatizzabili.

Scopo dello studio. Confrontare le prestazioni analitiche di un metodo immunochimico automatizzato sulla nuova piattaforma IDS-Isys (Immunodiagnostic Systems Ltd.) con quelle di un dosaggio RIA consolidato (DiaSorin).

Metodi. RIA: estrazione con acetonitrile, riconosce sia la vitamina D2 che la D3 (vitamina D totale). IDS-iSYS: diretto ma con pretrattamento automatizzato per favorire la dissociazione tra vitamina D e proteine leganti, misura sia la D2 che la D3 (vitamina D totale), ed è basato sulla chemiluminescenza derivata dalla competizione tra vitamina D contenuta nei campioni e vitamina D coniugata con acridinio per lo stesso anticorpo legato a particelle magnetiche. Sono stati utilizzati sieri selezionati dalla routine del laboratorio. L'analisi della precisione è stata condotta su tre pool di sieri, processati venti volte nella stessa seduta o nell'arco di quattro settimane utilizzando due lotti di reagenti diversi e tre calibrazioni.

Risultati. Il nuovo metodo richiede una minima quantità di campione (10 µL) e presenta un intervallo di misura fino a 140 ng/mL; la sensibilità analitica, calcolata come media+2DS dei valori ottenuti da venti replicati del calibratore zero, è pari a 5.0. I valori di CV intra-serie risultano: 8.3%, 5.4% e 5.0% per concentrazioni di 7.1, 17.7 e 40.6, mentre i CV inter-serie sono 14.9%, 15.2% e 12.6% per valori medi di 7.3, 17.7 e 41.1. La correlazione di Passing e Bablok (N=141) mostra la seguente equazione:  $RIA=1.22 \times IDS-3.51$ ; la concordanza, calcolata secondo la rappresentazione grafica di Altman e Bland, evidenzia uno scostamento medio pari a -1.6% (IC 95%, da -7.3 a 4.2).

Conclusioni. A fronte degli indubbi vantaggi dell'automazione e della misurazione diretta, il dosaggio automatizzato sembra fornire risultati sovrapponibili a quelli del metodo RIA, almeno nell'intervallo di concentrazioni intermedie, che risultano più importanti per le decisioni cliniche. La sottostima dei livelli più alti potrebbe essere spiegata dal differente riconoscimento dei metaboliti della vitamina D.

165

### SECOND GENERATION PTH ASSAY PRATICABILITY AS FIRST LEVEL TEST FOR DIALYZED PATIENTS: IS IT POSSIBLE TO HYPOTHESIZE A REFLEX PTH TEST?

L. Bassi<sup>1</sup>, S. Rizzardi<sup>1</sup>, F. Malberti<sup>3</sup>, G. Pinardi<sup>2</sup>, A. Ballabio<sup>4</sup>, M.G. Barbarini<sup>1</sup>, L. Comelini<sup>1</sup>, S. Testa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Az. Osp. Ist. Ospitalieri di Cremona, Presidio Cremonese

<sup>2</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Az. Osp. Ist. Ospitalieri di Cremona, Presidio Oglio Po

<sup>3</sup>U.O. Nefrologia, Az. Osp. Ist. Ospitalieri di Cremona, Presidio Cremonese

<sup>4</sup>Serv. Lab. Analisi, Osp. di Castel S. Giovanni (PC)

**Background.** Parathyroid hormone (PTH) determination is fundamental in Chronic Renal Failure (CRF) patients monitoring. Renal function reduction determines vitamin D reduction and hyperphosphatemia, and hypocalcemia comes and causes secondary Hyperparathyroidism. This disease is treated with Vitamin D analogues, to control PTH secretion. After many years with 1<sup>st</sup> generation PTH assays, actually different 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation tests are available, all sensitive to PTH fragments.

**Aim of the Study.** 1) Evaluate PTH correlation between Duo PTH IRMA Kit Scantibodies Laboratory, Inc. (Whole + N-truncated PTH fragment) – PTH 1, Access iPTH CLIA on UniCelDxl800 Beckman Coulter - PTH2; 2) Define possible therapeutic variations due to PTH2 test application compared to PTH1; 3) Evaluate possible advantages due to new diagnostic protocol with routine PTH2 and reflex Whole PTH, as confirmatory test.

**Methods.** Population: 103 dialyzed patients (age 26-88, 39 females, 64 males) samples were withdrawn before dialysis session, centrifuged immediately at 4°C and frozen at -80°C for 2 months, then tested for both PTH1 and PTH2.

**Results.** 1) PTH1 mean = 305,21±287,65, median = 210; PTH2 mean = 287,43±253,95, median = 222.  $r = 0,9812$  ( $P < 0,0001$ ),  $y = 1,1114x - 14,241$ ,  $r^2 = 0,9628$ . Considering National Kidney Foundation (NKF) guidelines K/DOQUI reference range (dialyzed 150-300 pg/mL), concordance is 86%; 2) 6 patients (5,6%) should have different therapy with PTH2; 3) Bland&Altman graph shows only 1 discordant sample under 300 pg/mL and 6 above (PTH1 more elevated). **Conclusion.** Analyzed methods show optimal correlation. Only 5,8% patients should have a different management. Our data support Access PTH as 1<sup>st</sup> level test and Scantibodies as 2<sup>nd</sup> level above 300 pg/mL hypothesis. Beckman Coulter PTH method is rapid (40'), easy to use, total automated on Access or Dxl, and shows a significant Turn Around Time reduction compared to Duo PTH IRMA. Access iPTH should be tested daily, and IRMA Scantibodies weekly for Access test results above 300 pg/mL only.

#### Reference

National Kidney Foundation. K/DOQUI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-S246.

166

### DETERMINAZIONE DEGLI STEROLI PLASMATICI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON RIVELATORE FID

R. Barone<sup>1</sup>, M. Gelzo<sup>1</sup>, S. Clericuzio<sup>1</sup>, G. Corso<sup>2</sup>, A. Dello Russo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università di Foggia

**Obiettivo.** Utilizzare un metodo gascromatografico (GC-FID) alternativo al metodo GC-MS per lo screening del profilo degli steroli plasmatici.

**Metodi.** Per l'analisi quantitativa degli steroli plasmatici sono state costruite le rette di calibrazione per: colesterolo, 7-DHC, latosterolo,  $\beta$ -sitosterolo e 5 $\alpha$ -colestano come standard interno. Il tempo di ritenzione (Rt) e quello di ritenzione relativo (Rf) per ogni analita sono stati impiegati per l'identificazione dei composti. L'imprecisione del metodo GC-FID è stata eseguita su 2 pool di plasma: 1) pool di plasma da pazienti non affetti (QC negativo); 2) pool di plasma negativo addizionato di 7-DHC, latosterolo e  $\beta$ -sitosterolo standard (QC positivo). L'efficienza del metodo di estrazione e il carry-over sono stati verificati. L'accuratezza è stata valutata confrontando i risultati del colesterolo ottenuti con il metodo GC-FID con quelli ottenuti con il metodo enzimatico-colorimetrico.

**Risultati.** I tempi di ritenzione relativi ottenuti con gli standard corrispondono a: 5 $\alpha$ -colestano (Rf =0.64), colesterolo (Rf =1.00), 8-DHC (Rf=1.02), 7-DHC (Rf=1.07), latosterolo (Rf =1.10),  $\beta$ -sitosterolo (Rf =1.43). Le rette di calibrazione per il colesterolo, 7-DHC, latosterolo e  $\beta$ -sitosterolo mostrano coefficienti di correlazione (r) compresi tra 0.9978 e 0.9985. Il controllo di qualità, effettuato sui QC positivo e negativo, per colesterolo, 7-DHC, latosterolo e  $\beta$ -sitosterolo mostrava CV% compresi tra 8,9% e 10,3%. Il recupero e il carry-over sono rispettivamente pari al 100% ed inferiore allo 0,5%. La correlazione tra il metodo enzimatico-colorimetrico e il GC-FID per il colesterolo nei campioni negativi era:  $y = 1.09x + 5.1$  ( $r = 0.951$ ) e nei campioni SLOS era:  $y = 1.001x + 4.2$  ( $r = 0.853$ ).

**Conclusioni.** Il metodo GC-FID è valido per l'analisi degli steroli plasmatici. È più rapido del metodo GC-MS, in quanto non necessita la derivatizzazione degli steroli. Il colesterolo GC-FID ben correla con quello enzimatico. La GC-MS resta il metodo gold standard per la diagnosi di conferma di campioni positivi. Comunque nei casi fortemente sospetti dal punto di vista clinico è consigliabile effettuare sempre anche l'analisi in GC-MS.

#### Bibliografia

1. Herman GE. *Hum Mol Genet* 2003;1:75-88.

167

**SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO RAPIDO PER L'ANALISI DEGLI STEROLI DA SPOT DI SANGUE INTERO MEDIANTE GC/FID**

M. Gelzo<sup>1</sup>, G. Corso<sup>2</sup>, S. Clericuzio<sup>1</sup>, R. Barone<sup>1</sup>, A. Dello Russo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università di Foggia

**Obiettivo.** Implementare un metodo di screening del profilo degli steroli direttamente su spot di sangue intero mediante gascromatografia con rilevatore FID (GC/FID). Il profilo degli steroli è utile per la diagnosi degli errori congeniti del metabolismo del colesterolo, tra cui la sindrome di Smith-Lemli-Opitz (SLOS)<sup>(1)</sup> è la più nota.

**Metodi.** Uno spot di sangue intero, corrispondente ad un volume pari a 12.4 µl, è stato usato per la calibrazione, il controllo di qualità (QC) ed i campioni. Il sangue intero negativo (QC neg) ed il sangue addizionato di 7-DHC, latosterolo e sitosterolo (QC pos), sono stati utilizzati per valutare l'imprecisione nel giorno (CV%-intra) e tra i giorni (CV%-inter). È stata valutata la variabilità tra diversi spot di uno stesso paziente SLOS e la stabilità degli steroli monitorando i livelli del colesterolo e dei DHCs in pazienti SLOS (n=2) nel tempo (24 h e 10 giorni a temperatura ambiente e a 4°C).

**Risultati.** Nell'ambito di un ampio intervallo di concentrazione, il coefficiente di correlazione (r) medio (n=3) delle calibrazioni risulta pari a 0.9908 per il colesterolo, 0.9982 per il 7-DHC, 0.9981 per il latosterolo e 0.9963 per il sitosterolo. Il QC negativo per il colesterolo mostra un CV%-intra pari a 4.7 ed un CV%-inter di 6.3. I CV%-intra ed -inter per il QC positivo sono rispettivamente: 0.9 e 3.8 per il colesterolo, 7.1 e 13.6 per il 7-DHC, 4.3 e 6.1 per il latosterolo, 5.3 e 4.9 per il sitosterolo. Il CV% delle determinazioni effettuate su 3 diversi spot di uno stesso paziente SLOS è pari a 6.6 per il colesterolo, 1.0 per il 7-DHC e 4.0 per il 7-DHC. In accordo con dati precedenti, i livelli di DHCs negli spot mostrano una riduzione del 60-80% a distanza di 10 giorni dalla prima analisi effettuata entro le 24h dal prelievo<sup>(2)</sup>.

**Conclusioni:** Il metodo GC/FID su spot di sangue mostra buone caratteristiche analitiche per lo screening del profilo degli steroli. La qualità e la conservazione dello spot influiscono sul risultato analitico.

**Bibliografia**

1. Tint GS, et al. N Engl J Med. 1994;330(2):107-13.
2. Corso G, et al. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002;766(2):365-70.

168

**TOTAL CoQ10 PLASMA LEVELS IN HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS**

S. Macchi<sup>1</sup>, P.D. Signò<sup>1</sup>, L. Maroni<sup>2</sup>, L. Castiglioni<sup>2</sup>, L. Guasti<sup>2</sup>, A. Venco<sup>2</sup>, G. De Luca<sup>1</sup>, F. Pallotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Circolo Hospital-Clinical Biochemistry Laboratory, Dept of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Insubria, Varese

<sup>2</sup>Section of Internal Medicine, Dept of Clinical Medicine, University of Insubria, Varese

**Introduction.** Coenzyme Q10 (CoQ10) is an endogenous enzyme cofactor produced by all living cells in humans. Among its functions, it plays a role as a catalyst in proton/electron translocation in mitochondria and lysosomes and protects mitochondria from free radical damage. Secondary CoQ10 deficiency is mainly due to the effects of statins which block the biosynthetic pathway of CoQ10 (1), common to cholesterol biosynthesis pathway. The use of statins is often associated with muscle pain associated with high serum levels of creatine kinase (CK).

**Aim.** The aim of our study is to compare plasmatic CoQ10 levels in different groups of persons: normal non dyslipidemic patients, hypercholesterolemic with high or normal CK plasma levels, and hypercholesterolemic in statin therapy. Selected patients don't show symptoms related to skeletal muscle complaints.

**Materials and Methods.** We have measured total CoQ10 plasmatic levels, using an HPLC method, in 41 normal subjects, in 12 with high pathological levels of total cholesterol and CK, in 12 hypercholesterolemic and with normal CK levels, and in 30 patients under statin treatment.

**Results.** Total CoQ10 plasma levels are higher in hypercholesterolemic patients (iperCK: 801 ± 310 µg/L; normoCK: 834 ± 226) than in normal patients (354 ± 128 µg/L); 12 patients in statin therapy with a good response to the treatment (decrease of LDL-cholesterol by 15%), present intermediate levels of CoQ10 (342 ± 193 µg/L). 18 patients in statin therapy with low response to therapy, present higher CoQ10 levels (605 ± 362 µg/L).

**Conclusions.** According to our data, we can confirm that CoQ10 plasma levels are influenced by cholesterol ones and not directly related to CK plasma levels. Moreover, we can demonstrate that hypercholesterolemic patients who undergo statin therapy have lower CoQ10 plasma levels if therapy works (lowering LDL levels, the most important CoQ10 carrier in blood). Measurement of total CoQ10 plasma level could give important information about the lipidic profile in patients selected for statin treatment, not only in the evaluation of possible collateral effects linked to statin use.

**References**

1. Littarru GP, 2007. Coenzyme Q10 and statins: Biochemical and clinical implications. Mitochondrion 7S(2007) S168-S174

169

**INFLUENCE OF A REGULAR, STANDARDIZED MEAL ON CLINICAL CHEMISTRY ANALYTES**

G. Lippi<sup>1</sup>, G.L. Salvagno<sup>1</sup>, G. Lima-Oliveira<sup>2</sup>, M. Gelati<sup>1</sup>, M. Montagnana<sup>1</sup>, E. Danese<sup>1</sup>, G. Picheth<sup>3</sup>, A. Duarte<sup>2</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Verona, Italy

<sup>2</sup>University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of Parana, Curitiba-PR, Brazil

**Background.** Although it is widely acknowledged that the lipemia influences the concentration and/or the activity of several analytes in blood, the fasting time is often disregarded as a potential source of preanalytical variability.

**Objective.** To evaluate the effects of fasting time in blood sample collection by venipuncture on clinical chemistry analytes.

**Methods.** Venous blood specimens were drawn in the morning from 17 fasting volunteers. The subjects ate a regular meal (563 Kcal) in 10 min. Sequential venipunctures were performed before the meal and 1, 2 and 4 hours later. Blood was collected by 20 G straight needles, directly into 3.5-mL vacuum tubes containing gel and lithium heparin. We assayed concentrations of alanine aminotransferase (ALT), albumin, alkaline phosphatase (ALP), amylase, amylase pancreatic, aspartate aminotransferase (AST), direct bilirubin (BD), total bilirubin (BT), blood urea nitrogen (BUN), calcium, chloride, cholesterol, C-reactive protein (CRP), creatinine, creatine kinase (CK), g-glutamyltransferase (GGT), glucose (GLU), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), iron (Fe), lactate dehydrogenase (LDH), magnesium (Mg), phosphate (P), potassium (K), total protein (TP), sodium (Na), triglycerides (TG) and uric acid (UA) on a Roche/Hitachi Modular System P (Roche Diagnostics GmbH). Significance of differences between samples was assessed by paired Student's t-test. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The biases following 1, 2 and 4 hours after the meal were compared with the current desirable quality specifications for bias, derived from biologic variation.

**Results.** Statistically significant differences exceeded the analytical quality specifications for desirable bias for P, GLU, TG, Fe, TP, Na, Ca, Mg and Alb. No significant biases could be recorded for the others analytes.

**Conclusion.** The significant variation of several clinical chemistry parameters after a regular meal demonstrates that the fasting time needs to be carefully considered when performing testing, in order to prevent spurious results and reduce laboratory errors especially in the emergency setting.

**Reference**

Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:720-7.

170

**LE LDL INDUCONO STRESS OSSIDATIVO E DANNO CELLULARE IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE IN FUNZIONE DEL GRADO DI S-OMOCISTEINILAZIONE**

A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, G. Pintus<sup>1</sup>, A. Posadino<sup>1</sup>, A. Cossu<sup>1</sup>, L. Gaspa<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari

È noto che l'interazione tra cellule endoteliali vascolari ed LDL modificate induca alterazioni intracellulari che rappresentano lo stadio iniziale dello sviluppo della placca aterosclerotica. A dispetto dell'approfondita conoscenza sugli effetti delle altre modificazioni covalenti delle LDL, la S-omocisteinilazione delle lipoproteine e gli eventuali effetti che essa determina rimangono ad oggi ancora poco studiati. Poiché è noto come l'omocisteina induca un danno intracellulare attraverso la generazione di ROS, abbiamo studiato se anche l'esposizione alle LDL S-omocisteinilate (Hcy-S-LDL) era in grado di determinare una produzione intracellulare di tali prodotti. A questo scopo sono state incubate cellule endoteliali umane (HEC) con LDL native (N-LDL) ed LDL precedentemente trattate con concentrazioni crescenti di omocisteina (tra 1 e 100  $\mu\text{mol/L}$ ) ed è stata monitorata la concentrazione intracellulare di ROS. I dati indicano che i livelli di ROS crescevano al crescere del grado di omocisteinilazione delle LDL, suggerendo così un effetto pro-ossidante delle stesse. Per verificare se le Hcy-S-LDL potessero influire sulla proliferazione cellulare, abbiamo esaminato la velocità di sintesi del DNA (misurata attraverso l'incorporazione di timidina [3H]), in HEC esposte sia a N-LDL che alle Hcy-S-LDL. Le LDL S-omocisteinilate inducevano una significativa riduzione nell'incorporazione di timidina [3H] suggerendo un effetto inibente della proliferazione cellulare. Tale effetto era evidente già nelle LDL precedentemente incubate con omocisteina 10  $\mu\text{mol/L}$ . Le Hcy-S-LDL inoltre riducevano significativamente la vitalità delle cellule di più del 20 % se confrontate con le N-LDL. In conclusione, sebbene la comprensione dei meccanismi attraverso i quali le Hcy-S-LDL agiscano necessita di ulteriori studi ed approfondimenti i nostri dati indicano che l'incremento di ROS intracellulari potrebbe essere il principale responsabile delle alterazioni della vitalità e proliferazione cellulare.

171

### PLASMA MARKERS OF CHOLESTEROL HOMEOSTASIS IN RELATION TO BRAIN VOLUMES IN MEMORY CLINIC PATIENTS

V. Leoni<sup>1</sup>, A. Salomon<sup>3</sup>, M. Shafaati<sup>2</sup>, M. Kivipelto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Division of Biochemistry and Genetics, National Institute of Neurology "C. Besta", Milano, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Laboratory Medicine, Division of Clinical Chemistry, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Huddinge, Sweden

<sup>3</sup>Dept. of Neurology, University of Kuopio, Finland

<sup>4</sup>Aging Research Center, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

**Background.** Cholesterol has been linked to Alzheimer's disease (AD). This study aims to investigate the relation of plasma 24-hydroxycholesterol (marker of brain cholesterol metabolism), lanosterol, lathosterol (marker of cholesterol synthesis), cholesterol, and 27-hydroxycholesterol (markers of extracerebral cholesterol homeostasis) with brain volumes in memory clinic patients.

**Methods** 96. patients (33 with subjective cognitive impairment–SCI; 36 with mild cognitive impairment–MCI; 27 with AD) referred to the Memory Clinic at Karolinska University Hospital, Sweden, with available plasma samples and MRI scans. Plasma analysis were done by isotope dilution-mass spectrometry. MRI measurements were assayed using custom-made software BMAP, running on the HERMES Unix workstation platform developed in the imaging laboratory at Karolinska Institutet.

**Results** 24-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, lanosterol and lathosterol were significantly lower in patients with AD compared to MCI or SCI. No statistical difference were observed for total and LDL-, HDL-cholesterol. Controlling for age, sex, APOE genotype and statins, 24OHC was positively correlated with Gray Matter and parenchymal fractions in the SCI group only ( $p < 0.05$ ). There was a significant positive association between cholesterol and white matter and parenchymal fractions in patients with AD.

**Conclusions.** Plasma 24OHC reflects the number of metabolically active neurons in the brain. The lack of association between 24OHC and brain volumes in AD patients may be due to the previously demonstrated abnormal expression of cholesterol 24S-hydroxylase in astrocytes in AD. The findings on cholesterol agree with previous reports of decreasing plasma cholesterol levels in AD patients, suggesting a CNS-mediated effect on extracerebral cholesterol homeostasis.

172

### FOSFOLIPIDI OSSIDATI COME MARKER DI ATEROSCLEROSI PRECOCE. EVIDENZE IN GIOVANI FUMATORI

G.B. Faccini<sup>1</sup>, A. Pasini<sup>2</sup>, M. Cominacini<sup>2</sup>, C.

Stranieri<sup>2</sup>, S. Manfro<sup>2</sup>, M.G. Bonetto<sup>1</sup>, C. Gerani<sup>1</sup>, R.

Poffe<sup>1</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Morfologico Biomediche, Sez. di Chimica e Microscopia Clinica, Policlinico "G.B. Rossi", Università di Verona

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Medicina Interna D, Policlinico "G.B. Rossi", Università di Verona

L'aterosclerosi è un processo infiammatorio cronico caratterizzato da cellule immunitarie attivate, aumentata concentrazione di lipoproteine modificate a bassa densità (oxLDL) con infiltrazione miointimale, che sembrano segnare l'inizio della formazione della stria lipidica. Berliner et al. hanno identificato tre fosfolipidi particolarmente bioattivi derivanti dall'ossidazione dell'1-palmitoil-2-arachidonil-fosforilcolina (oxPAPC): palmitoil-epoxyisoprostan-PC (PEIPC), palmitoil-oxovaleroil-PC (POVPC) e palmitoil-glutaroil-PC (PGPC), in grado di indurre in vitro molecole di adesione e citochine infiammatorie.

**Scopo del lavoro.** Dimostrare la presenza serica e cellulare di un'aumentata concentrazione di POVPC, PGPC e PEIPC nei soggetti giovani sani fumatori rispetto al gruppo di controllo di soggetti sani non fumatori.

**Materiali e Metodi.** I dosaggi di PAPC, POVPC, PGPC e PEIPC plasmatici e linfomonocitari (LMC), sono stati ottenuti mediante HPLC-MS (ion-trap), eluizione isocratica, modalità di acquisizione Single Ion Monitorino (SIM).

**Risultati.** I rilievi sono stati eseguiti su 26 soggetti giovani sani non fumatori ("NF") e 25 soggetti giovani sani fumatori ("F"), con medesime caratteristiche antropometriche e profilo lipidico. Le differenze di concentrazione dei fosfolipidi ossidati sono illustrate nella seguente tabella:

**PLASMA:**

ngPOVPC/mgPAPC: NF  $2.02 \pm 0.30$  - F  $2.44 \pm 0.6$  -  $p < 0.004$ ;

ngPGPC/mgPAPC: NF  $2.07 \pm 0.39$  - F  $2.19 \pm 0.5$  - p Ns;

ngPEIPC/mgPAPC: NF  $1.46 \pm 0.67$  - F  $2.70 \pm 0.64$  -  $p < 0.001$ ;

**LINFOMONOCITI**

ngPOVPC/mgPAPC: NF  $0.65 \pm 0.19$  - F  $0.87 \pm 0.30$  -  $p < 0.004$ ;

ngPGPC/mgPAPC: NF  $2.73 \pm 0.74$  - F  $3.98 \pm 0.74$  -  $p < 0.001$ ;

ngPEIPC/mgPAPC: NF  $1.64 \pm 0.34$  - F  $2.21 \pm 0.54$  -  $p < 0.05$ ;

**Conclusioni.** Il presente lavoro dimostra che nel gruppo FUMATORI sono presenti aumentate concentrazioni di oxPAPC (vs NON FUMATORI) che potrebbero indurre un processo infiammatorio cronico. La determinazione degli oxPAPC serici e LMC potrebbe diventare un marker sensibile di aterosclerosi precoce.

**Bibliografia**

Watson AD, Leitinger N, Subbanagounder G, et al. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids. J Biol Chem 1997; 272:13597-607.

173

**EVALUATION OF A NEW POCT METHOD FOR cTnI AND NT-proBNP ASSAY**R. Ndreu<sup>1</sup>, C. Prontera<sup>2</sup>, G.C. Zucchelli<sup>1</sup>, A. Clerico<sup>3</sup><sup>1</sup>Istituto di Fisiologia Clinica CNR, Pisa<sup>2</sup>Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa<sup>3</sup>Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento Sant'Anna, Pisa

**Background.** The Dxpess™ Reader is a new POCT device set up for the measurement of NT-proBNP and troponin I (cTnI) in fresh human EDTA whole blood samples. The aim of this study is to evaluate the analytical characteristics of this POCT method and to compare its clinical results with the methods available for clinical routine in our laboratory.

**Methods.** Some blood samples were repeatedly measured in order to estimate the assay imprecision in the study, blood samples containing a large spectrum of NT-proBNP and cTnI concentrations collected from patients with cardiovascular diseases were used. For the comparison with the POCT method, NT-proBNP assay the ECLIA method (Roche Diagnostics) and the ACCESS (Beckman Coulter) and ADVIA Centaur (Siemens Diagnostics) platforms for cTnI assay were used.

**Results.** For NT-proBNP values measured with the Dxpess™ Reader method the imprecision ranged from about 20 CV% to 10 CV% and showed a good correlation ( $R=0,95$ ) with those obtained with the fully automated Elecsys method. Considering a working range of 0.12-30 ng/mL for cTnI, the imprecision ranged from about 30 CV% to 7 CV% and the cTnI values showed a good correlations with those obtained with the two fully automated platforms, ACCESS ( $R=0,96$ ) and ADVIA Centaur ( $R=0,94$ ) methods.

**Conclusions.** The present study indicates that the analytical performance of NT-proBNP and cTnI assays based on the Dxpess™ Reader is comparable with other commercially available POCT methods, previously evaluated in our laboratory. Moreover, the measured NT-proBNP and cTnI levels by Dxpess™ Reader methods showed a high degree of correlation with the methods available for clinical routine in our laboratory. Taken these data as a whole, the present evaluation suggests that the methods based on the Dxpess™ Reader can be considered as a useful tool for the measurement of NT-proBNP and cTnI assays, especially in primary care and emergency department, as well as at patient bed.

174

**FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE NELLA POPOLAZIONE APERTA**N. Ursicino<sup>1</sup>, E. Zepponi<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Scienze Diagnostiche, ASL di Rieti

**Premessa e Scopo.** La ASL ha offerto alla popolazione a marzo 2009 uno screening gratuito per il rischio cardiaco e renale. Come parametri di rischio cardiovascolare sono stati considerati il colesterolo (totale e HDL) e l'omocisteina (Hcy), valutando anche la mieloperossidasi (MPO), in ragione del possibile valore predittivo per la disfunzione endoteliale (1).

**Metodi.** Sono stati arruolati 602 soggetti (età media: 53,6+/-14,9 mediana 55), 228 maschi (età media: 57,0+/-15,3; mediana 59) e 374 femmine (età media: 51,6+/-14,3; mediana 53). Il colesterolo è stato determinato su siero con metodica standard, mentre per Hcy e MPO (plasma EDTA) sono state utilizzate metodiche in chemiluminescenza su analizzatore ARCHITECT (Abbott Diagnostici). I parametri sono stati considerati separatamente per maschi e femmine e per decenni di età, valutando media, mediana e percentuali di soggetti eccedenti i limiti di normalità.

**Risultati.** I livelli di MPO erano analoghi tra maschi e femmine (media: 120,0+/-237,5 pmol/L; mediana 87,1, con valori eccedenti il 95° percentile atteso (inserto) nel 3,5% dei soggetti. I valori di Hcy (umol/L) erano più elevati ( $p<0,05$ ) nei maschi (13,8+5,5) che nelle femmine (10,4+3,7), l'11,8% dei soggetti presentava livelli incrementati (15-30) e lo 0,8% valori elevati (>30). Valori >200 mg/dL di colesterolo erano presenti nel 70,9% dei soggetti, in misura analoga nei maschi (68,9%) e nelle femmine (73,2%). La correlazione con l'età era meno evidente che per Hcy, e valori anormali (<40) di colesterolo HDL erano riscontrabili nel 5,3% dei soggetti (10,1% nei maschi e 2,4% nelle femmine;  $P<0,01$ ).

**Conclusioni.** Nella popolazione che ha aderito allo screening, prevalentemente di età media e avanzata, è frequentissimo il riscontro di valori elevati di colesterolo totale, probabilmente per fattori dietetici. Sia questo che i valori di Hcy appaiono correlati con l'età e Hcy con il sesso maschile, mentre al contrario i livelli di MPO non mostrano differenze significative legate ai parametri demografici. È opportuno mettere in atto procedure adeguate di "counseling".

**Bibliografia**

1. Vita JA, Brennan M-L, Gokce N, et al. Serum Myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004;110:1134-9.

175

**VALUTAZIONE DELL'ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DI NUOVI BIOMARCATORI CARDIACI IN MEDICINA D'URGENZA**S. Betteto<sup>1</sup>, S. Bethaz<sup>1</sup>, F. Vicino<sup>1</sup>, M. Maggiorotto<sup>2</sup>, F. Formoso<sup>2</sup>, S. Battista<sup>2</sup>, G. Mengozzi<sup>1</sup>, C. Baldi<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. "Baldi e Riberi", A.O.U. San Giovanni Battista di Torino<sup>2</sup>Dip. di Emergenza, A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

Obiettivo dello studio. Analisi retrospettiva del ruolo diagnostico dei nuovi biomarcatori circolanti pro-adrenomedullina (proADM) e proANP (peptide natriuretico atriale) nella gestione di pazienti afferenti al pronto soccorso con dispnea e dolore toracico.

Pazienti. 196 soggetti (età media 69.3 anni, 76 femmine) giunti al pronto soccorso nell'arco di tre settimane, suddivisi in cinque gruppi: 25 controlli dimessi, 33 pazienti con visita cardiologica negativa (ambulatoriali), 31 pazienti con prova da sforzo e/o coronarografia negative (negativi), 34 con coronarografia positiva e posizionamento di stent (positivi), e 73 soggetti con diagnosi alla dimissione di scompenso cardiaco. Metodi: le concentrazioni plasmatiche dei nuovi marcatori sono state determinate mediante dosaggi immunochimici (B.R.A.H.M.S AG) automatizzati su analizzatore Kryptor, basati sull'utilizzo di anticorpi diretti contro le regioni centrali delle due molecole (MR-proADM e MR-proANP).

Risultati. Le concentrazioni di proADM risultano significativamente aumentate nei pazienti con scompenso cardiaco (media±DS, 1.11±0.85 nmol/L, IC 95%, 0.88-1.35; p<0.0001, ANOVA e p<0.05, correzione di Bonferroni vs gli altri gruppi: controlli 0.41±0.32, 0.27-0.55; ambulatoriali 0.38±0.23, 0.29-0.46; negativi 0.51±0.72, 0.24-0.77; positivi 0.61±0.56, 0.41-0.81). L'elaborazione della curva ROC evidenzia una buona accuratezza diagnostica (AUC = 0.78, IC 95% 0.71-0.85); la migliore combinazione tra sensibilità (79%) e specificità (69%) si ottiene a 0.52 nmol/L. Il dosaggio di NT-proBNP mostra una AUC pari a 0.88 (0.83-0.93). Esiste una discreta correlazione tra proADM e NT-proBNP (R<sup>2</sup>=0.32), di grado inferiore rispetto a quella tra i valori di proANP rilevati nel gruppo dei pazienti con scompenso cardiaco (353±388 pmol/L, 267-439, mediana 278, 192-321) e NT-proBNP (R<sup>2</sup>=0.51).

Conclusioni. La disponibilità di nuovi dosaggi immunochimici automatizzati consente la riduzione del TAT anche per i biomarcatori cardiaci proposti. Se considerati singolarmente non sembrano apportare informazioni aggiuntive, la loro potenziale utilità diagnostica deve essere valutata nell'ambito di una strategia multiparametrica per la stratificazione del rischio e per il monitoraggio della terapia.

176

**POSITIVITA' DELLA TROPONINA CARDIACA T IN PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO ACUTO: PREVALENZA E SIGNIFICATO CLINICO E PROGNOSTICO**G. Bonetti<sup>1</sup>, F. Stefini<sup>1</sup>, S. Bugatti<sup>2</sup>, V. Lazzarini<sup>2</sup>, C. Lombardi<sup>2</sup>, L. Bettari<sup>2</sup>, M. Metra<sup>2</sup>, F. Pagani<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili di Brescia<sup>2</sup>Cardiologia, Università e A.O. Spedali Civili di Brescia

Introduzione. Lo scompenso cardiaco acuto (ScA) è una condizione associata ad elevata mortalità e morbilità. Nei pazienti (pz) con ScA può presentarsi necrosi miocardica, resa evidente dal rilascio della troponina cardiaca (cTn), e questa può contribuire al peggioramento della funzione cardiaca ed alla prognosi infausta di questi pazienti.

Scopo dello studio. Valutare la prevalenza e il significato prognostico dell'incremento della cTnT in un gruppo di pz ricoverati per ScA in terapia diuretica infusiva.

Materiali e Metodi. In 198 pz consecutivi con ScA, età media 68±12 anni, senza segni e sintomi suggestivi di sindrome coronarica acuta, ricoverati presso la terapia intensiva cardiologica del nostro ospedale è stata determinata la cTnT su Elecsys® 2010 su prelievi eseguiti all'ingresso, dopo 6 e 12 ore. E' stato considerato come positivo qualsiasi valore di cTnT >0.03 µg/L (CV ≤10%). Nel follow-up mediano di 286 gg (IQR 122-494) sono stati registrati i dati relativi a morte o nuova ospedalizzazione.

Risultati. 78 pz (39%) presentavano almeno un valore positivo di cTnT (T+). Confrontati con i pz con cTnT ≤0.03 µg/L (T-), i primi presentavano una maggiore prevalenza d'ipertensione (68% vs 53%, p=0.031), cardiopatia ischemica (72% vs 50%, p=0.003), diabete (54% vs 31%, p=0.001) ed erano più anziani (età media 72±10 vs 66±12 anni, p<0.001). Per quanto riguarda la terapia, i pz T+ ricevevano nelle prime 24 ore più alte dosi di furosemide ev (513±436 vs 285±195 mg/24 ore, p<0.001) ed avevano più elevata probabilità di essere trattati con nitrati ev (68% vs 36%, p<0.001). Durante il follow-up si sono verificati 19 decessi per causa cardiovascolare nel gruppo T+ vs 15 nel gruppo T- (28% vs 13%, P=0.024). L'incidenza di riospedalizzazioni per aggravamento dello scompenso è stata del 47.8% nei pazienti T+ rispetto al 34.8% nei pazienti T- (NS).

Conclusioni. Nei pz con ScA è frequente il riscontro di elevate concentrazioni sieriche di cTnT. I pazienti con elevata cTnT presentano più comorbilità, hanno più probabilità di essere trattati con vasodilatatori e diuretici a dosaggi più elevati, e presentano una prognosi peggiore.

Bibliografia

Clin Chim Acta 2005;352:143-53.

177

**VALUTAZIONE DELLA RICADUTA ORGANIZZATIVA NEI LABORATORI DI PATOLOGIA CLINICA DELL'AZIENDA OSPEDALIERA DI DESENZANO, DOPO L'EMISSIONE DEL PROTOCOLLO "RACCOMANDAZIONI PER L'IMPIEGO OTTIMALE DEI BIOMARCATORI NEL DOLORE TORACICO E DISPNEA"**

G. Cocchi<sup>1</sup>, E. Bernardi<sup>1</sup>, B. Milanese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica, Osp. di Desenzano, A.O. Desenzano del Garda

Scopo. Definizione di raccomandazioni pratiche con lo scopo di ridurre la variabilità di comportamento esistente fra i vari medici di una stessa istituzione e migliorare l'appropriatezza delle richieste. In questo studio si è valutata la ricaduta organizzativa nella richiesta dei test diagnostici dopo l'emissione, nel gennaio 2008, del protocollo sull'impiego ottimale dei biomarcatori nel dolore toracico e dispnea.

Materiali e Metodi. Valutazione statistica del numero e della diversa tipologia dei biomarcatori utilizzabili in due reparti di riferimento, nel primo semestre dei due anni precedenti e nei due successivi alla presentazione del protocollo. I dati sono espressi come rapporto fra il singolo test ed il totale delle richieste pervenute. I reparti dei tre presidi ospedalieri sono: il Pronto Soccorso, per la sua caratteristica peculiare di filtro della richiesta esterna, di rapido intervento e decisione terapeutica, la Cardiologia, abituale sede per il trattamento di pazienti con problemi cardio-vascolari.

Risultati. Pronto Soccorso: si evidenzia la sostanziale costanza della richiesta di enzimi non cardio-specifici (CK, LDH, AST, ALT) pur in presenza di un aumento dei test specifici (TNI e CK-MB). In un Presidio rimane l'abitudine di richiedere i 4 enzimi in contemporanea, senza differenziarne la richiesta a seconda della patologia; anche TNI e CK-MB vengono richieste contemporaneamente, senza privilegiare la Troponina come suggerito. In tutti i Presidi l'esame Mioglobina con il tempo è stato abbandonato. Il test NT-proBNP, anche per il costo elevato, è stato eseguito solamente su richiesta del Cardiologo. In effetti nel Presidio dove viene usato maggiormente, la richiesta è passata da 231 a 64 test dal 2008 al 2009.

Cardiologia. L'appropriatezza della richiesta di esami è molto più evidente in ogni Presidio. Non solo in riferimento ai 4 enzimi, che sono diminuiti ovunque, ma anche all'aumento dell'uso della TNI, alla diminuzione del CK-MB massa e alla eliminazione del CK-MB attività.

Conclusioni. Anche se con possibilità di ulteriore miglioramento si può affermare che il protocollo ha portato miglioramento nell'appropriatezza della richiesta di esami con indubbi vantaggi sia clinici che economici.

178

**APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA DI TROPONINA IN PRONTO SOCCORSO: DATI PRELIMINARI**

M. Ramondetta<sup>1</sup>, N. Bettinardi<sup>1</sup>, R. Zanettini<sup>2</sup>, L. Leoni<sup>1</sup>, E. Rampoldi<sup>1</sup>, F. Porro<sup>3</sup>, E. Torresani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

<sup>2</sup>U.O. Cardiologia Riabilitativa, A.O. ICP, Milano

<sup>3</sup>U.O. Medicina D'Urgenza, Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Le richieste di troponina (TnT) dal nostro Pronto Soccorso (PS) sono incrementate nel corso degli anni, per cui si è voluto valutarne l'appropriatezza.

Metodo. Dal 1 al 15/01/2009 le richieste sono state 400 per 306 pazienti, divisi in 3 gruppi di diagnosi di ammissione: 30% dolore toracico, 20% dispnea, 50% altra diagnosi. Sono stati considerati: fattori di rischio ( $\geq 2$ ), eventi pregressi, referto ECG, diagnosi di dimissione. Abbiamo calcolato: TAT (check-in/validazione), timing e numero di dosaggi, richiesta marcatori cardiaci obsoleti contestualmente al secondo dosaggio di TnT.

Risultati. Dei 61 pazienti del gruppo "dispnea" 8 presentavano 2 o più fattori di rischio e 9 pazienti eventi pregressi; il 33% aveva ECG normale e il 59% anomalo (9% non refertato); il 44% è stato dimesso dal PS con diagnosi di malattia cardiovascolare. Dei 152 pazienti del gruppo "altra diagnosi" 24 presentavano 2 o più fattori di rischio e 23 pazienti eventi pregressi; il 43% aveva ECG normale e il 43% anomalo (14% non refertato); il 9% è stato dimesso con diagnosi di malattia cardiovascolare. Seconda richiesta di TnT nel gruppo "dolore toracico": 47%. Altri marcatori: transaminasi 51%, LDH 55%, CK 83%, Mioglobina 36%. TAT: 56 min, timing medio di ripetizione (n=94): 6h 50 min.

Discussione. Nei gruppi "dispnea" e "altra diagnosi" l'85% e il 72% dei pazienti aveva più di 2 fattori di rischio e/o eventi pregressi e/o ECG anomalo; esiste quindi il razionale scientifico per la richiesta di TnT; il TAT e il timing medio rispettano le Linee Guida Internazionali. Il numero di ripetizioni della TnT nel gruppo "dolore toracico" risulta inferiore a quanto raccomandato. Rimane elevata la richiesta di marcatori obsoleti.

Conclusione. Nel nostro PS, la richiesta di TnT è appropriata nei pazienti con diagnosi di ammissione diversa da "dolore toracico"; in questa categoria le richieste, secondo le Linee Guida Internazionali, sono inferiori all'atteso. E' utile un aggiornamento sulla validità dei marcatori cardiaci, per aumentare la percentuale di seconde valutazioni della TnT e ridurre le richieste di marcatori obsoleti.

Bibliografia

Thygesen K et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007 Nov 27;116(22):2634-53.

179

### COMPARISON OF DIFFERENT IMMUNOASSAYS FOR TOTAL ADIPONECTIN IN HUMAN PLASMA OF PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY

C. Caselli<sup>1</sup>, M. Maltinti<sup>1</sup>, O. Melaiu<sup>1</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>2</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, D. Neglia<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa

<sup>2</sup>Scuola Superiore S. Anna, Pisa

**Background.** Plasma concentrations of adiponectin, an adipocytokine secreted almost exclusively by adipose tissue, have been linked to many human diseases in numerous cross-sectional and prospective studies. At present, it is considered as a new diagnostic/prognostic marker in the cardiovascular disease. Aim of the study was to determine the analytical characteristics of two different commercially available immunoassays (ELISA) for total adiponectin measurement and to compare the predictive performance of plasma adiponectin as a function of the different assay methods as to dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods.** Plasma total adiponectin levels were measured by using two different commercially available ELISA platforms: LINCO and ALPCO. These systems mainly differ for sample pre-treatment and standard preparation for dose-response curve. Both ELISAs were evaluated for precision, analytical sensitivity and linearity of dilution. Blood samples from 102 patients with DCM (64 males, mean age 57±12 yrs, BMI 27.2±3.9; NYHA I-III, LVFE% < 50) and from 40 age-matched healthy subjects were tested. The association of adiponectin, measured by the two methods, with DCM was examined using the receiver operative characteristic (ROC) curves.

**Results.** A strong correlation between total adiponectin evaluated by LINCO and ALPCO ( $r=0.99$ ) was observed although the values obtained by ALPCO are lower of about 50% with respect to LINCO, as clearly showed by Bland-Altman plot, which suggests the presence of a proportional error. As to the identification of cardiac patients as a whole, total adiponectin measured by LINCO appeared to have the better ability (LINCO: AUC 0.78, CI 95% 0.66-0.89,  $p<0.01$ ; ALPCO: 0.68, CI 95% 0.57-0.79,  $p=0.03$ ) to predict the presence of cardiovascular disease than total adiponectin measured by ALPCO.

**Conclusion.** The analytical features of both the ELISA systems appear to be suitable to reliably assay plasma levels of total adiponectin. The values obtained with the two different systems are different, but strongly correlated. In our conditions, LINCO platform exhibits a higher predictive performance that needs to be confirmed on a larger group of subjects.

#### Reference

Shibata R, et al. Adiponectin and cardiovascular disease. *Circ J* 2009;73:608-14.

180

### RILASCIO ACUTO DI TROPONINA CARDIACA T IN PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO ACUTO: SIGNIFICATO CLINICO E PROGNOSTICO

G. Bonetti<sup>1</sup>, F. Stefani<sup>1</sup>, S. Bugatti<sup>2</sup>, V. Lazzarini<sup>2</sup>, C. Lombardi<sup>2</sup>, L. Bettari<sup>2</sup>, M. Metra<sup>2</sup>, F. Pagani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili di Brescia

<sup>2</sup>Cardiologia, Università e A.O. Spedali Civili di Brescia

**Introduzione.** Nei pazienti (pz) con scompenso cardiaco acuto (ScA) può presentarsi necrosi miocardica, resa evidente dal rilascio della troponina cardiaca (cTn), e questa può contribuire al peggioramento della funzione cardiaca ed alla prognosi infausta di questi pazienti.

**Scopo dello studio.** Valutare la prevalenza ed il significato prognostico del rilascio di cTnT in un gruppo di pz ricoverati per ScA in terapia diuretica infusiva.

**Materiali e Metodi.** In 180 pz consecutivi con ScA, età media 68±12 anni, senza segni e sintomi suggestivi di sindrome coronarica acuta è stata determinata la cTnT su Elecsys® 2010 su prelievi eseguiti al momento del ricovero, e dopo 6 e 12 ore. Il rilascio acuto di cTnT (RIL+) è stato definito come la presenza di almeno un valore positivo per necrosi miocardica, cioè  $cTnT > 0.03 \mu\text{g/L}$  (CV  $\leq 10\%$ ), con incremento superiore al 30% rispetto al prelievo eseguito al momento del ricovero. Nel follow-up mediano di 285 gg (IQR 118-491 gg) venivano registrati i dati relativi a morte o a nuove ospedalizzazioni per cause cardiovascolari.

**Risultati.** 39 pz (22%) mostravano RIL+. Confrontati con i pz senza rilascio acuto (RIL-), questi presentavano una maggiore prevalenza di cardiopatia ischemica (72% vs 51%,  $p=0.0361$ ), diabete (67% vs 33%,  $p<0.001$ ) ed erano più anziani (età media 71±11 vs 67±12 anni,  $p=0.044$ ). Dal punto di vista terapeutico i pz RIL+ avevano ricevuto più alte dosi di furosemide ev nelle prime 24 ore (489±383 vs 316±239 mg/die,  $p<0.001$ ) e avevano più probabilità di essere trattati con nitrato o nitroprussiato ev (74% vs 39%,  $p<0.001$ ). Durante il ricovero le morti erano superiori nel gruppo RIL+ rispetto al gruppo RIL- (13% vs 5%, NS). Nel periodo di follow-up successivo al ricovero le morti per causa cardiovascolare sono state del 26.5% nei pz RIL+ e del 16.4% in quelli RIL- (NS); la sopravvivenza cumulativa libera da ospedalizzazioni per aggravamento della sintomatologia (metodo Kaplan-Meier) è risultata inferiore nei pz RIL+ ( $p=0.0372$ ).

**Conclusioni.** Nei pz con ScA, il rilascio acuto di cTnT si configura come un fattore prognostico negativo, dimostrandosi, quindi, un indicatore di una maggiore gravità del paziente e dell'episodio di ScA.

#### Bibliografia

*Eur J Heart Fail* 2007;9:776-86.

181

### UTILIZZO DELLE CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DI MIELOPEROSSIDASI NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA SINDROME CORONARICA ACUTA IN PAZIENTI AFFERENTI AL PRONTO SOCCORSO

G. Martinasso<sup>1</sup>, F. Vicino<sup>1</sup>, S. Bethaz<sup>1</sup>, M. Maggiorotto<sup>2</sup>, F. Formoso<sup>2</sup>, S. Betteto<sup>1</sup>, S. Battista<sup>2</sup>, G. Mengozzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. "Baldi e Riberi", A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

<sup>2</sup>Dip. di Emergenza, A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

**Premessa e Scopo.** Le concentrazioni circolanti di mieloperossidasi (MPO) appaiono correlate con la patologia miocardica ischemica, in quanto associate ad una maggiore gravità della lesione e ad un valore prognostico indipendente.

Scopo di questo studio è valutare il significato di una singola determinazione delle concentrazioni di MPO in una popolazione di pazienti giunti in pronto soccorso con sospetto di coronaropatia.

**Metodi.** Sono compresi nella valutazione 54 pazienti consecutivi con sindrome coronarica acuta (SCA) documentata su base clinica, sottoposti a coronarografia ed angioplastica. Il gruppo di controllo è costituito da 119 soggetti (visita cardiologica negativa, prova da sforzo o coronarografia negativa) e 98 pazienti con diagnosi di scompenso cardiaco. Un singolo campione di plasma EDTA di ciascun paziente è stato processato con una metodica immunochimica in chemiluminescenza (CMIA) automatizzata su analizzatore ARCHITECT (Abbott Diagnostics).

**Risultati.** Le concentrazioni medie $\pm$ DS di MPO nei soggetti con SCA sono 468.5 $\pm$ 914.1 pmol/L (intervallo di valori, 61.9-6085.9) mentre nei due gruppi di controllo i valori risultano inferiori e mostrano una minore variabilità (controlli: 229.9 $\pm$ 180.2, 39.6-865.4; scompenso 273.5 $\pm$ 221.0, 62.6-1778.5) ( $p=0.014$  secondo l'analisi ANOVA, e  $p<0.05$  per i confronti tra i gruppi secondo il test di Bonferroni). Le distribuzioni dei risultati mostrano un andamento simile nei due gruppi di controllo e bimodale nei pazienti con SCA. Utilizzando come soglia 527 pmol/L, corrispondente al 99° percentile dei soggetti normali come riportato dalla ditta produttrice, la frequenza di valori elevati è superiore nella SCA (22.2%) rispetto agli altri due gruppi (10.3% e 10.5%). L'area sotto la curva ROC non evidenzia un valore diagnostico significativo per SCA (0.58).

**Conclusioni.** Il riscontro di valori elevati di MPO è più frequente nei pazienti con sindrome coronarica acuta rispetto ad altri pazienti con patologie cardiovascolari o con sintomi suggestivi di SCA ma negativi ai controlli cardiologici. Una singola determinazione non pare rivestire un valore diagnostico; l'analisi sequenziale in pazienti con SCA potrebbe fornire maggiori indicazioni per un utilizzo clinico di questo parametro di infiammazione.

182

### CARDIOMETABOLIC BIOMARKERS IN A SWINE MODEL OF MYOCARDIAL INFARCTION

C. Caselli<sup>1</sup>, O. Melaiu<sup>1</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>2</sup>, M. Campan<sup>2</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa

<sup>2</sup>Scuola Superiore S. Anna, Pisa

**Background.** Inflammation, extra-cellular matrix (ECM) remodeling and adipokine system activation represent essential processes of molecular response to cardiac injury. **Aim.** Evaluation of biomarkers of inflammation and ECM remodeling as well as of adiponectin system in an experimental animal model of myocardial infarction (AMI).

**Methods.** Left ventricular (LV) tissue was collected from male adult pigs with AMI (n=6), induced by permanent surgical ligation of the left anterior descending coronary artery and from 6 healthy pigs. Proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ ), matrix metalloproteinases (MMP)-2,-9, their tissue inhibitors (TIMP)-1,-2 and collagen (COL3 $\alpha$ ) were evaluated. In addition, adiponectin and its receptors, adipo-R1 and adipo-R2, were evaluated, owing its anti-inflammatory actions. mRNA expression was determined by RT-PCR in tissue samples collected from border (BZ) and remote zones (RZ) of infarcted area. Tissue concentrations were evaluated by Western Blotting.

**Results.** This surgical approach resulted in a permanent transmural infarction affecting 10-15% of the LV wall mass and after 4 weeks the mRNA expression of biomarkers, normalized on the respective GAPDH, was significantly higher in infarcted regions than in controls, both in the BZ and RZ (MMP-9: 7.09 $\pm$ 4.31; 1.18 $\pm$ 0.28; 0.72 $\pm$  0.11, respectively for BZ, RZ and controls,  $p<0.05$  BZ vs. RZ and controls; TIMP-1: 2.41 $\pm$ 1.20; 0.28 $\pm$ 0.04; 0.33 $\pm$ 0.05,  $p=0.01$ ; TIMP-2: 2.75 $\pm$ 1.51; 0.53 $\pm$ 0.04; 0.38 $\pm$ 0.03,  $p<0.05$ ; COL3 $\alpha$ : 4.28 $\pm$ 1.11; 0.87 $\pm$ 0.13; 0.61 $\pm$ 0.18,  $p<0.0004$ ). BZ and RZ inflammatory indices were both increased in AMI. Adiponectin was significantly increased compared with controls (2.95 $\pm$ 1.69 vs. 0.52 $\pm$ 0.12,  $p<0.05$  BZ vs controls) as well as the Adipo-R1 (BZ: 1.40 $\pm$ 0.31, RZ: 1.26 $\pm$ 0.20, controls: 0.63 $\pm$ 0.07;  $p<0.05$  BZ and RZ vs controls).

**Conclusions.** The inflammatory and ECM remodelling processes are activated after myocardial injury together with the system of adiponectin, confirming its involvement in the process of cardiac remodelling/repair. The knowledge of the interaction between the various mediators of the complex response to cardiac damage could be an important target for new therapies.

**Reference**

Shibata R et al, Cardiovasc Res 2007 Jun 1;74(3):471-9.

183

### MEASUREMENT OF ADIPONECTIN AND ITS MULTIMERS IN HUMAN PLASMA: A METHODOLOGICAL REAPPRAISAL

C. Caselli<sup>1</sup>, M. Maltinti<sup>1</sup>, O. Melaiu<sup>1</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>2</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, D. Neglia<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa

<sup>2</sup>Scuola Superiore S. Anna, Pisa

**Background.** Adiponectin is an adipose tissue-derived adipokine present in peripheral plasma. Different oligomers of adiponectin are found in human plasma: trimer (low-molecular-weight, LMW), hexamer (middle-molecular-weight, MMW) and high-molecular weight (HMW) forms. Multimer formation is recognized as an important mechanism modulating the biological functions of this adipokine. HMW form is considered the active form and its plasma levels are associated with metabolic and cardiovascular disease. Thus, HMW has emerged as a biomarker for patients at increased cardiometabolic risk.

**Aim of the study** was to evaluate the analytical characteristics of an immunometric system for total as well as multimeric adiponectin determination, including an error propagation study of variability associated to the assay of multimers and to determine their circulating levels in patients with dilated cardiomyopathy (DCM).

**Methods.** Samples from 102 patients (64 males, mean age  $57 \pm 12$  yrs, BMI  $27.2 \pm 3.9$ ; NYHA I-III, LVFE%  $< 50$ ) and 40 healthy subjects were tested by an ELISA system (Alpco Diagnostics, US). This system directly measures T and, after treatment with two different specific proteases, the HMW and the sum of MMW and HMW forms, while the levels of the MMW and LMW were obtained by calculation. The predictive performance of total and HMW adiponectin as to cardiac patients was examined using the receiver operative characteristic curves (ROC).

**Results.** We observed a strong correlation between total and HMW adiponectin ( $r=0.87$ ). Both, total and HMW adiponectin, were increased in DCM patients with respect to controls, but significantly only total adiponectin ( $p=0.02$ ). ROC analysis did not showed a significant difference between total and HMW adiponectin in the prediction of the presence of this cardiovascular disease (total adiponectin: AUC 0.68, CI 95% 0.57-0.79,  $p=0.03$ ; HMW: 0.67, CI 95% 0.56-0.77,  $p=0.43$ ).

**Conclusion.** ALPCO platform for adiponectin assay exhibits analytical characteristics allowing for clinical application, although further studies need to demonstrate if the HMW isoform is more strongly associated to disease condition than total adiponectin.

**Reference**

Tsutamoto T et al. Eur Heart J 2007;28:1723-30.

184

### DIFFERENZE REGIONALI NELL'ESPRESSIONE CARDIACA DI BIOMARCATORI DEL PROCESSO APOPTOTICO: STUDIO IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI SCOMPENSO CARDIACO INDOTTO DA PACING

T. Prescimone<sup>1</sup>, C. Caselli<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>1</sup>, V.

Ottaviano<sup>2</sup>, V. Lionetti<sup>1</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Biochimica cardiovascolare, CNR Istituto di Fisiologia Clinica, Fondazione Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa Italia

<sup>2</sup>Dip. di Patologia sperimentale BMIE, Facoltà di Medicina, Università di Pisa

**Introduzione.** La possibilità di modulare l'apoptosi, che costituisce un processo chiave nell'evoluzione dello scompenso cardiaco (SC), ha aperto recentemente nuovi scenari terapeutici.

**Scopo.** Valutare l'attivazione del processo apoptotico a livello delle diverse pareti del ventricolo sinistro (Vsx) in un modello animale di SC, indotto da pace-maker.

**Metodi.** Sono stati studiati 13 minipig maschi adulti, di cui 5 controlli. Lo SC veniva indotto tramite stimolazione con pace-maker ad alta frequenza. L'espressione a livello di mRNA delle Caspasi (CASP)-3,-9 e dei relativi sistemi di regolazione, Bcl-2 e Hsp 72, è stata valutata sia nel sito di inserzione del pace-maker (PS) che nella parete opposta (OS) del Vsx tramite RT-PCR semiquantitativa. Per valutare l'indice apoptotico è stato utilizzato il test di TUNEL. Infine, come indice di infiammazione, è stata determinata l'espressione del TNF- $\alpha$ .

**Risultati.** Dopo 21 giorni di pacing si osserva una riduzione della LVEF% ( $24,0 \pm 3,7$  vs.  $70,8 \pm 3,7$ ,  $p < 0,001$ , media  $\pm$  sem) e una diminuzione dello spessore della parete del Vsx a livello del sito di pacing con conseguente riduzione dell'attività contrattile cardiaca. L'espressione dei seguenti biomarcatori è risultata significativamente aumentata nella PS rispetto ai controlli: CASP-3:  $1,28 \pm 0,125$  vs.  $0,82 \pm 0,10$   $p=0,02$ ; Bcl-2:  $0,90 \pm 0,60$  vs.  $0,63 \pm 0,033$   $p=0,01$ ; Hsp72:  $0,72 \pm 0,10$  vs.  $0,28 \pm 0,098$   $p=0,014$ ; TNF- $\alpha$   $0,67 \pm 0,11$  vs.  $0,33 \pm 0,09$   $p=0,048$ . Non sono state osservate differenze significative né fra OS e controlli né fra PS e OS. La Casp-9 rimane invariata nella PS rispetto ai controlli e aumenta nella OS ( $0,8 \pm 0,11$  vs.  $0,99 \pm 0,26$ ,  $p=ns$ , vs  $1,01 \pm 0,16$   $p=0,341$ ). La metodica TUNEL non ha rilevato la presenza di cellule apoptotiche né nella PS che nella OS

**Conclusioni.** Questi risultati indicano che l'attivazione del processo apoptotico, principalmente localizzata nella PS, non è accompagnata da un aumento di cellule apoptotiche. Questa osservazione è in accordo con il parallelo aumento dei sistemi di controllo del processo apoptotico e suggerisce che in questa condizione un possibile stato metastabile dovuto al bilanciamento di molecole pro- ed anti-apoptotiche.

**Bibliografia**

Lionetti V et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007;293:H2747-56.

185

### INCREASED ADRENOMEDULLIN AND NORADRENALINE LEVELS IN PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY WITHOUT OVERT HEART FAILURE AND LEFT BUNDLE BRANCH BLOCK: AN EFFECT OF ASYNCHRONY?

M.A. Morales<sup>1</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>, M. Maltinti<sup>1</sup>, M. Piacenti<sup>1</sup>, C. Prontera<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>, D. Neglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa, Italy

**Background.** Left bundle branch block (LBBB) is reported in a high percentage of patients (pts) with idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC). A wide QRS and an increased adrenergic activity are associated with poorer prognosis and higher all-cause mortality rate. Relationship between LBBB and sympathetic activation is not fully understood.

**Aim.** Of to assess whether LBBB plays any role on the adrenergic activation in IDC pts without overt heart failure. **Material and Methods.** 87 IDC patients (mean age: 61 years, 50 Males, LV ejection fraction -LVEF- 34±1%, LV end diastolic dimension -LVEDD- 61±1 mm (NYHA Class I-II) were enrolled into the study. 40 pts showed LBBB on the surface ECG (QRS duration 138±8 msec); 47 had normal QRS duration.

All pts were under treatment with b-blockers, diuretics, spironolactone, ACE inhibitors or angiotensin-II receptor blockers. Blood samples for brain natriuretic peptide (BNP), aldosterone, noradrenaline and adrenomedullin (ADM) were taken within 1 week from a conventional echocardiographic exam.

**Results.** The two groups of pts were comparable for age (63 vs. 60 years), male sex (22/27), type of treatment, LVEF% (35.1±1.4 vs. 36.1±1.1), LVEDD (61.1±1 vs. 60.5±0.8 mm). At 2D echocardiography, an outward motion of the interventricular septum during systole was observed by two independent observers in 38/40 LBBB pts and in none with normal QRS.

Comparable BNP (124±30 vs. 118±24 pg/ml) and aldosterone (173±22 vs. 171±20 pg/ml) levels were found in the two groups; conversely, higher values of noradrenaline (599.6±65 vs 416.8±29, pg/ml, p=0.01) and ADM (23.1±1.4 vs 17.8±1.3 pmol/l, p=0.03) were found in LBBB pts. At multivariate analysis noradrenaline and ADM remained significantly associated with LBBB after correction for other clinical, therapeutic, functional and biohumoral variables.

**Conclusions.** In IDC pts, LBBB is associated with higher noradrenaline and ADM circulating levels, independently of global

LV function. These results may suggest a relationship between LBBB-induced myocardial asynchrony and increase in activation of the sympathetic system.

186

### INCREASED PLASMA LEVELS OF OSTEOPONTIN ARE ASSOCIATED WITH ACTIVATION OF THE RENIN-ALDOSTERONE SYSTEM AND WITH MYOCARDIAL AND CORONARY MICROVASCULAR DAMAGE IN DILATED CARDIOMYOPATHY

S. Del Ry<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>, M. Maltinti<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>2</sup>, C. Prontera<sup>1</sup>, A. Iervasi<sup>1</sup>, C. Caselli<sup>1</sup>, A. Mazzone<sup>1</sup>, D. Neglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and Fondazione G. Monasterio, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy

<sup>2</sup>Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

**Background.** In patients with dilated cardiomyopathy (DCM) abnormal myocardial blood flow (MBF) has been associated with coronary microvascular dysfunction.

**Aim.** To test the hypothesis that osteopontin (OPN) plasma levels could be associated with the activation of the renin-aldosterone system (RAS) in these patients and be involved in mediating myocardial and coronary damage.

**Methods.** In 66 patients with idiopathic left ventricular dysfunction of variable severity the plasma levels of OPN were correlated with biomarkers of systemic metabolism, RAS activation (plasma renin activity-PRA and aldosterone) and myocardial dysfunction (B-type natriuretic peptide-BNP) as well as with clinical indexes of LV function and perfusion obtained by 2D-echocardiography and Positron Emission Tomography.

**Results.** As compared to controls, patients showed a significant increase of inflammatory markers (OPN: 508±30.8 ng/ml vs. 426.9±16.4, p<0.05 and Interleukin (IL)-6: 1.71±0.29 pg/ml vs. 0.38±0.03 pg/ml, p<0.001) and of indexes of cardiac damage. BNP and IL-6 but not OPN were related with the severity of LV dysfunction. By contrast, OPN plasma levels were significantly correlated with the extent of microvascular dysfunction as expressed by MBF at rest (r=-0.42, p=0.01) and during dipyridamole (r=-0.63, p=0.0003) and with PRA (r=0.26, p=0.04). Both in patients with milder or more severe LV dysfunction lower MBF values were associated with higher OPN levels and PRA.

**Conclusions.** OPN plasma levels are associated with the activation of the RAS and with the extent of coronary microvascular dysfunction in patients with DCM. These results suggest a interdependent role of RAS and vascular inflammation in cardiomyopathy.

187

**VALUTAZIONE DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER LE TROPONINE I E T MISURATE CON METODI AD ALTA SENSIBILITÀ**

C. Prontera<sup>1</sup>, A. Mercuri<sup>3</sup>, G.C. Zucchelli<sup>3</sup>, S. Storti<sup>1</sup>, S. Giovannini<sup>3</sup>, S. Turchi<sup>3</sup>, A. Clerico<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa

<sup>2</sup>Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento Sant'Anna, Pisa

<sup>3</sup>Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

Background. Come raccomandato dalle linee guida internazionali, va considerato clinicamente rilevante un aumento della troponina cTnI e cTnT al di sopra del 99° percentile della distribuzione della popolazione di riferimento (99° URL) per la diagnosi differenziale della sindrome coronaria acuta. Nel nostro laboratorio abbiamo calcolato i valori del 99° URL per alcuni metodi di dosaggio della cTnI e cTnT di nuova generazione.

Materiali e Metodi. Abbiamo arruolato per lo studio 164 soggetti apparentemente sani (88 maschi e 76 femmine) con un'età media di 43.3±19.5 anni (range 18-86 anni). Sono stati utilizzati per il dosaggio della cTnI il metodo TnI-Ultra (ADVIA CP®, Siemens Medical Solutions Diagnostics Srl) e il metodo Access AccuTnITM (UniCell® Dxl 800, Beckman Coulter), mentre la cTnT è stata misurata con il metodo ad alta sensibilità di nuova generazione (HS-cTnT) e il metodo standard (Elecsys 2010, Roche Diagnostics).

Risultati. Il metodo standard per il dosaggio della cTnT ha mostrato valori non dosabili in tutti i campioni testati. I valori misurati del 99° URL sono stati: 87 ng/L per il metodo cTnI ADVIA, 40 ng/L per il metodo cTnI Access e 37 ng/L per il metodo HS-cTnT, rispettivamente. I valori di cTnI e cTnT misurati con i differenti metodi erano significativamente correlati fra di loro ( $p < 0.001$ , Spearman rank correlation test). E' stata trovata una correlazione altamente significativa fra l'età ed i valori di cTnI, misurati con il metodo ADVIA ( $Rho = 0.527$ ,  $p < 0.0001$ ), e quelli di cTnT, misurati con il metodo HS ( $Rho = 0.336$ ,  $p < 0.0001$ ). E' stata anche trovata una correlazione altamente significativa fra i valori di NT-proBNP (misurati con la piattaforma Elecsys, Roche Diagnostics) ed i valori di cTnI, misurati con i metodi ADVIA ( $Rho = 0.346$ ,  $p < 0.0001$ ), e quelli di cTnT, misurati con il metodo HS ( $Rho = 0.301$ ,  $p < 0.0001$ ).

Conclusioni. Si conferma che soggetti adulti apparentemente sani presentano valori misurabili di cTnI e cTnT se si utilizzano per il dosaggio metodi ad alta sensibilità di nuova generazione. Si conferma inoltre che i valori di cTnI e cTnT dei soggetti adulti sani, come anche i valori di riferimento (compreso il 99° URL), dipendono oltre che dal metodo di dosaggio anche dall'età dei soggetti testati.

188

**VALUTAZIONE DI UNA NUOVA TECNICA PER LA QUANTIFICAZIONE DI CITOCINE SIERICHE: THE HUMAN CARDIOVASCULAR 7PLEX FLOWCYTOMIX MULTIPLEX KIT**

E. Novello<sup>1</sup>, M.C. Sanzari<sup>1</sup>, G. Pantano<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova

Introduzione. Scopo del lavoro è stato quello di validare una nuova tecnica citofluorimetrica che permette la quantificazione simultanea di più citochine sieriche, considerate come importanti fattori predittivi di rischio cardiovascolare.

Materiali e Metodi. Il kit Human Cardiovascular 7plex FlowCytomix Multiplex (Bender MedSystems GmbH, Austria) permette di dosare contemporaneamente: sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sVCAM-1, sP-selectin and t-PA. Prevede l'utilizzo di biglie di differenti dimensioni e intensità di fluorescenza rivestite da anticorpi diretti verso le citochine, un secondo anticorpo biotinilato riconosce l'analita sulla superficie delle biglie; come sistema rilevatore viene utilizzata Streptavidina-PE che lega il coniugato biotinilato ed emette segnali di fluorescenza a 578 nm con intensità proporzionale alla quantità delle citochine. L'intensità di fluorescenza media (MIF) viene elaborata matematicamente da un apposito software e trasformata in concentrazione di soluto. Per valutare le prestazioni di questa tecnica così complessa si sono rese necessarie più sedute analitiche. Sono state comparate differenti matrici (siero, plasma con differenti anticoagulanti) e il materiale è stato trattato in tubi e in piastre al fine di valutare quale preparazione fornisce le migliori performance. E' stata infine valutata l'imprecisione Intra-serie dosando 6 campioni in 5 replicati ciascuno. L'analisi citofluorimetrica è stata condotta sull'analizzatore FC500 (Beckman Coulter). Tutte le concentrazioni sono espresse in pg/mL, fatta eccezione per sP-selectin e sVCAM-1 che sono espresse in ng/mL. Risultati. Le migliori curve degli standard si sono ottenute utilizzando campioni ottenuti in plasma con NA-citrato. Range di concentrazioni e CV% Intra-serie sono risultati: 2520.80-5672.55(4.77-35.94) per sCD40L; 588.76-6764.4(4.20-11.23) per t-PA; 166.6-2457.96(4.10-9.51) per MCP-1; 501.46-1107.45(7.84-28.38) per sP-selectin; 813.17-3343.08(5.16-15.44) per sVCAM-1. I valori ottenuti per IL-6, IL-8 sono risultati al di sotto dei limiti di sensibilità del metodo.

Conclusioni. Le prestazioni analitiche del kit "Human Cardiovascular 7plex FlowCytomix Multiplex" si sono dimostrate soddisfacenti e confrontabili con le attuali tecniche ELISA in commercio.

189

**A2A AND A3, ADENOSINE RECEPTORS mRNA ARE OVEREXPRESSED IN AN EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL OF MYOCARDIAL INFARCTION**S. Del Ry<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>2</sup>, M. Campan<sup>2</sup>, C. Caselli<sup>1</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup><sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and Fondazione G. Monasterio, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy<sup>2</sup>Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. Adenosine, a purine nucleoside and a "retaliatory metabolite" in ischemia, is ubiquitous in the body, and increases 100-fold during ischemia. Its biological actions are mediated by four adenosine receptors (ARs): A1 and A3, coupled to Gi/o, and the high-affinity A2A and low-affinity A2B, coupled to Gs. Because A1R and A3R are distributed mainly in myocardial cells and A2 are on coronary vascular smooth cells in the heart, adenosine may substantially modulate cardiac function as a whole.

Aim. To determine possible myocardial alterations in the expression of ARs, in an experimental animal model of myocardial infarction (MI).

Materials and Methods. Left ventricular (LV) tissue was collected from male adult minipigs with MI (n=5), induced by permanent surgical ligation of the left anterior descending coronary artery and from 5 healthy pigs. mRNA expression of A1R, A2AR, A2BR, A3R was determined by semi-quantitative RT-PCR in tissue sampled collected from border (BZ) and remote zones (RZ) of infarcted area. Results: Transmural infarction affected about 15% of the LV wall mass. After 4 weeks, mRNA expression was higher in infarct regions than in control for A1R (controls=2.0±1.0, BZ=2.4±0.4, RZ=1.2±0.1), A2AR (controls=0.6±0.3, BZ=1.9±0.2, RZ=1.3±0.04 p=0.002, p=0.04, controls vs. BZ and RZ), A2BR (controls=1.1±0.5, BZ=1.2±0.2, RZ=0.5±0.04) and A3R (controls=0.2±0.07, BZ=2.4±0.7, RZ=0.7±0.07, p=0.006, p=0.002, controls vs. BZ and RZ).

Conclusion. All adenosine receptors, and especially A2A and A3, are overexpressed in the BZ of MI, consistently with an adaptative retaliatory anti-ischemic adenosinergic changes of post-infarcted heart.

Reference

Picano E et al. *Tips* 1998;19:14-16.

190

**ADENOSINE RECEPTORS mRNA EXPRESSION IN NORMAL AND FAILING MINIPIG HEART**S. Del Ry<sup>1</sup>, M. Cabiati<sup>2</sup>, E. Belcastro<sup>1</sup>, A. Simioniu<sup>2</sup>, C. Caselli<sup>1</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup><sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and Fondazione G. Monasterio, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy<sup>2</sup>Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. Chronic heart failure (HF) results in possibly beneficial endogenous adenosine accumulation. The final biological action of adenosine in a particular organ or cell population may depend on the relative expression level and signaling efficiency of the individual adenosine receptor (AR) subtypes.

Aim. To determine myocardial expression of ARs, in the different chambers of failing compared to normal minipig hearts.

Materials and Methods: Cardiac tissue (left and right atrium, left and right ventricle) was collected from male adult minipigs without (control, C, n=5) and with pacing-induced HF (n=5). ARs mRNA expression was evaluated by RT-PCR together with TNF- $\alpha$  mRNA expression.

Results. A1R, A2AR, A2BR and A3R were expressed in all cardiac regions analyzed and, after 3 weeks of pacing, in left ventricle mRNA of each ARs resulted more expressed than in controls (A3R/gapdh: C=0.2±0.07 vs. HF: 1.4±0.5 p=0.03). TNF- $\alpha$  mRNA expression resulted significantly higher in left ventricle of HF pig (p=0.009). We also observed a significant correlation between TNF- $\alpha$  mRNA expression and A1R (r=0.6 p=0.0002), A2AR (r=0.8 p<0.0001), A2BR (r=0.9 p<0.0001), A3R (r=0.7 p<0.0001).

Conclusion: ARs mRNA expression were characterized simultaneously in all cardiac chambers of normal and HF animals. All ARs, and especially AR3 subtype, are expressed in all cardiac chambers and, compared to controls, overexpressed in left ventricle.

Reference

Picano E et al. *Tips* 1998;19:14-16.

191

**BNP VALUES IN THE FIRST DAYS OF LIFE MEASURED WITH AN AUTOMATED IMMUNOASSAY PLATFORM**S. Storti<sup>1</sup>, M. Cantinotti<sup>1</sup>, M.S. Parri<sup>1</sup>, E. Volpi<sup>2</sup>, C. Prontera<sup>1</sup>, B. Murzi<sup>1</sup>, S. Giovannini<sup>1</sup>, A. Clerico<sup>2</sup><sup>1</sup>Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa<sup>2</sup>Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento Sant'Anna, Pisa

**Background.** The measurement of circulating of B-type natriuretic hormone (BNP) and its related peptides is now considered a useful marker of myocardial function, even in pediatric patients with cardiovascular diseases. In order to assess the reference values for BNP assay in the first days of life, we measured peptide concentrations with the fully automated platform in a large population of apparently healthy newborns and infants.

**Materials and Methods.** Plasma BNP was measured in 143 apparently healthy newborns throughout the first 10 days of extra-uterine life, as well as in 110 healthy infants with age ranging from 1 month to 12 years. All newborns were delivered at term (between 35 and 42 weeks of gestation) and presented at birth a body weight ranging from 2.5 to 4.1 Kg with an Apgar score  $\geq 8$ . In infants, clinical examination and normal values of laboratory tests excluded the presence of acute illness. Plasma BNP was measured with the fully automated Access platform (Triage BNP reagents, Access Immunoassay Systems, REF 98200, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA 92835).

**Results.** BNP showed the highest levels in the first two days of life with a progressive decline in the next days. Moreover, BNP values in the first month of life were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than the values observed in next periods (0-3 days: median 244 ng/l, range 41-866 ng/L, 97.5° percentile 759 ng/L; 3-30 days median 75 ng/l, range 10-763 ng/L, 97.5° percentile 741 ng/L; 1-12 months: median 19 ng/l, range 5-45 ng/L, 97.5° percentile 40 ng/L; 1-12 years: median 13 ng/l, range 4-46 ng/L, 97.5° percentile 40 ng/L). As a result, a significant negative correlation was found between BNP and age values considering all 253 samples together ( $p < 0.0001$ ). There was no significant difference between the BNP values respectively found in male and female infants.

**Conclusions.** Our study indicates that at least two reference decision values should be taken into account in order to exclude the presence of cardiac disease in newborns and infants. The first with higher BNP values, related to the first 3 days of extra-uterine life, and the other with lower BNP values, related to the infants' group with age from one month to 12 years.

192

**CONCENTRAZIONI DI MR-PROANP E DI MR-PROADM IN PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO**M.M. Mion<sup>1</sup>, F. Tosato<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, G.M. Boffa<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi di Padova, Padova<sup>2</sup>Dip. di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Università degli Studi di Padova, Padova

La regione media del propeptide natriuretico di tipo A (MR-proANP) e della pro-adrenomedullina (MR-proADM) sono stati recentemente proposti come nuovi biomarcatori potenzialmente utili nella gestione del paziente (pz) con scompenso cardiaco (SC) (1). L'ANP, peptide rilasciato principalmente dagli atri cardiaci, stimola fortemente la diuresi, la natriuresi e la vasodilatazione. L'ADM, peptide sintetizzato in diversi organi e tessuti tra cui il cuore, a livello del sistema cardiovascolare riduce la pressione sistemica e dilata le coronarie determinando un aumento della gittata cardiaca. Scopo dello studio: valutare il significato clinico delle concentrazioni di MR-proANP e di MR-proADM in pz con SC, in particolare in confronto ai livelli di NT-proBNP (frammento N-terminale del propeptide natriuretico di tipo B), biomarcatore di disfunzione miocardica utilizzato nella pratica clinica di routine. I livelli di NT-proBNP (test immunoenzimatico, Siemens Healthcare Diagnostics), di MR-proANP e di MR-proADM (test in immunofluorescenza, BRAHMS) sono stati determinati in campioni di plasma (EDTA) di n=48 pz (n=45 maschi, n=3 femmine; età: mediana, range=61, 20-75 anni) ricoverati con diagnosi di SC da disfunzione sistolica. Unità di misura: NT-proBNP ng/L, MR-proANP pmol/L, MR-proADM nmol/L. Limite superiore di normalità (dati del produttore): NT-proBNP=125 (<75 anni) e 450 (>75 anni); MR-proANP=85.2; MR-proADM=0.52. I pz sono stati suddivisi in due gruppi in base alla classificazione NYHA (New York Heart Association): A=NYHA I+II (n=20), B=NYHA III+IV (n=28). Mediana, range (NT-proBNP), (MR-proANP), (MR-proADM): A=(1073, <10-12606), (275, 11-1137), (0.71, 0.33-1.96); B=(2897, 409-13178), (340, 131-1291), (1.04, 0.29-3.00). A vs B (Mann-Whitney, p): (NT-proBNP), (MR-proANP), (MR-proADM)=(0.0120), (0.0609), (0.0361). Coefficiente di correlazione, r (Spearman, p): MR-proANP vs NT-proBNP=0.81 (<0.0001); MR-proADM vs NT-proBNP=0.71 (<0.0001); MR-proANP vs MR-proADM=0.79 (<0.0001). Le concentrazioni di MR-proANP e di MR-proADM correlano significativamente con quelle di NT-proBNP e variano sostanzialmente in relazione alla classificazione NYHA, dimostrando un'accuratezza diagnostica paragonabile a quella di NT-proBNP.

Bibliografia

1. J Cardiac Fail 2007;13:42-9.

193

### HIGH-SENSITIVITY TROPONIN ASSAY IMPROVES THE DETECTION OF CARDIAC INVOLVEMENT IN AL AMYLOIDOSIS AND IS THE MOST POWERFUL PROGNOSTIC DETERMINANT

G. Sarais<sup>1</sup>, A. Barassi<sup>2</sup>, G. Palladini<sup>1</sup>, R. Capra<sup>2</sup>, A. Foli<sup>1</sup>, P. Russo<sup>1</sup>, R. Albertini<sup>3</sup>, L. Zenone Bragotti<sup>1</sup>, L. Obici<sup>1</sup>, R. Moratti<sup>3</sup>, G.V. Melzi D'Eril<sup>2</sup>, G. Merlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro per lo Studio delle Amiloidosi, Lab. di Biotecnologie, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo e Università di Pavia

<sup>2</sup>Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Ospedale San Paolo, Università di Milano

<sup>3</sup>Servizio di Analisi Chimico-Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo e Università di Pavia

The severity of heart involvement (HI), assessed by NT-proBNP and cardiac troponins (cTn), is the main prognostic determinant in AL amyloidosis. We report the impact of a highly sensitive (hs) cTnT assay on assessment of HI, prognosis and response in 109 consecutive newly diagnosed AL amyloidosis patients.

Hs-cTnT was measured on the Modular E instrument with a precommercial immunoassay from Roche Diagnostics on frozen sera collected at diagnosis and stored at -80°C. The 99th centile of hs-cTnT concentration in sera from 546 healthy volunteers is 14 ng/L (95% CI 12.4-24.9 ng/L). NT-proBNP and cTnI were measured with available assays. The upper reference limit were 332 ng/L and 40 ng/L, respectively. HI was defined as mean wall thickness >12 mm at echocardiography in the absence of other cardiac cause.

Sixty-nine pts (63%) had HI. Among these, 74% had high cTnI, 96% elevated hs-cTnT and 100% high NT-proBNP. Fifteen pts without HI at presentation reached a cardiac wall thickness >12 mm within 6 months. Among them, cTnI was elevated at diagnosis in 33% of cases, hs-cTnT in 80% (p=0.01 compared to cTnI) and NT-proBNP in 73%, hs-cTnT and NT-proBNP can detect HI when it is unapparent at echo. Thirty-seven pts (34%) died, the median follow-up of living pts was 38 months (range 14-67 months). Survival was reduced in pts with hs-cTnT >14 ng/L (58% vs. 84% surviving at 3 years, p=0.01), NT-proBNP >332 ng/L (58% vs. 86% surviving at 3 years, p=0.02) and cTnI >40 ng/L (52% vs. 75% surviving at 3 years, p=0.007). Sixty-six pts (60%) reached hematologic response (HR). At multivariate analysis ln(hs-cTnT) was the only variable significantly associated with survival (HR 1.576, 95% CI 1.048-2.371, p=0.03). The hs-cTnT cutoff best predicting survival after treatment was 68 ng/L (45% vs. 80% surviving at 3 years, p=0.0003). This cutoff, in combination with HR, can differentiate 3 groups with different outcome. Estimated survival at 3 years was 30% in non responders with hs-cTnT >68 ng/L, 51% in those who obtained either HR or had hs-cTnT <68 ng/L (p=0.05) and 95% in responders with hs-cTnT <68 ng/L (p<0.0001).

Hs-cTnT assay is significantly more sensitive for AL cardiac damage, compared with commercially available cTn assay, and is the most powerful prognostic determinant.

194

### LE TROPONINE CARDIACHE NEL DOLORE TORACICO IN URGENZA: METODI TRADIZIONALI E AD ALTA SENSIBILITA' A CONFRONTO

M. Zaninotto<sup>1</sup>, M.M. Mion<sup>1</sup>, N. Vajente<sup>1</sup>, L.M. Biasucci<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi di Padova, Padova

<sup>2</sup>Istituto di Cardiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Per la misura delle troponine cardiache (cTnI e cTnT), riconosciuto gold standard biochimico per la diagnosi di infarto miocardico, sono attualmente disponibili nuovi metodi ad alta sensibilità (high sensitivity, hs) caratterizzati da un coefficiente di variazione (CV) ≤10% alla concentrazione corrispondente al 99° percentile dei valori ottenuti nei soggetti sani (1). Scopo dello studio: confrontare l'accuratezza diagnostica di metodi tradizionali e di nuovi metodi ad alta sensibilità in pazienti (pz) con dolore toracico in dipartimento d'emergenza (PS). Sono stati arruolati n=244 pz con dolore toracico: maschi n=142, femmine n=102; età: mediana, range=64, 15-94 anni. Le concentrazioni di cTn sono state determinate all'ammissione impiegando i sistemi: AIA-1800 ST (Tosoh, Bioscience; cTnI-A), Dimension VISTA (Siemens Healthcare Diagnostics; hs-cTnI-V), Elecsys 2010 (Roche Diagnostics; cTnT-R), Modular Analytics E170 (Roche Diagnostics; hs-cTnT-R). Livello decisionale per danno miocardico: cTnI, cTnT=concentrazione con CV ≤10% (cTnI-A=0.06 µg/L, cTnT-R=0.03 µg/L); hs-cTnI, hs-cTnT=99° percentile (hs-cTnI-V=0.045 µg/L, hs-cTnT-R=14 ng/L). I pz sono stati suddivisi in 4 gruppi (diagnosi di dimissione): DIM=pz dimessi dal PS (n=174); SCA=pz con sindrome coronarica acuta (n=26); N-SCA-C=pz non-SCA con dolore toracico di origine cardiaca (n=29); N-SCA-NC=pz non-SCA con dolore toracico di origine non cardiaca (n=15). cTn > livello decisionale in tutti i pz (n=244): cTnI-A=23 (9.4%); hs-cTnI-V=29 (11.9%); cTnT-R=34 (13.9%); hs-cTnT-R=60 (24.6%). cTn > livello decisionale nel gruppo SCA+N-SCA-C (n=55): cTnI-A=19 (34.5%); hs-cTnI-V=22 (40.0%); cTnT-R=27 (49.1%); hs-cTnT-R=36 (65.5%). cTn > livello decisionale nel gruppo DIM+N-SCA-NC (n=189): cTnI-A=4 (2.1%); hs-cTnI-V=7 (3.7%); cTnT-R=7 (3.7%); hs-cTnT-R=24 (12.7%). L'impiego di metodi ad alta sensibilità migliora la gestione in urgenza del paziente con dolore toracico rendendo la troponina marcatore biochimico sensibile oltre che specifico. Il monitoraggio dei pazienti dimessi con troponina positiva, consentirà di valutare se la migliorata sensibilità analitica aumenta la predittività del marcatore per eventi cardiaci o ne comprometta la specificità.

Bibliografia

1. J Am Coll Cardiol 2007;50:2173-95.

195

**SEQUENCING AND CARDIAC EXPRESSION OF NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTORS A AND C IN NORMAL AND HEART FAILURE PIGS**

M. Cabiati<sup>2</sup>, M. Campan<sup>2</sup>, C. Caselli<sup>1</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa, Italy

<sup>2</sup>Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

**Background.** Pharmacological treatments, such as with CD-NP, able to activate natriuretic receptors (NPRs) and to inhibit cardiac remodelling in heart failure (HF) patients, are currently under investigation. To better understand the therapeutic potential of the NPRs activation is necessary to dispose of experimental models devoid of confounding effects and reflecting only the natural history of the disease. The pig constitutes an animal model largely used in experimental pathology owing of its similarity with human anatomo-physiology but *Sus Scrofa* genome is not completely sequenced.

**Aim.** To complete the characterization of NPR system in *Sus Scrofa*, sequencing NPR-A and NPR-C and to evaluate NPRs mRNA expression as well as that of ANP and BNP in cardiac tissue of normal and HF minipigs in order to have a starting point for future studies devoted to check new potential drugs.

**Methods.** To sequence NPR-A and NPR-C gene in *Sus Scrofa* we exploited the high homology between species, in particular between human and pig. For this reason, the optimal conditions were obtained using human cardiac tissue deriving from left ventricle (LV) of patients undergoing heart transplantation. ANP, BNP, NPR-A and NPR-C mRNA expressions were evaluated using cardiac tissue samples collected from adult male minipigs (weight 35–40 kg) without (control, n=4) and with pacing-induced HF (n=5). **Results.** Pig NPR-A and NPR-C mRNA were sequenced and resulted in 179 and 203 bp, respectively (GenBank accession n°: FJ518622, FJ518621 respectively). Compared to control, ANP and BNP gene expression resulted higher in all the cardiac chambers of HF heart. This increase is associated to a down-regulation of NPR-A and an up-regulation of NPR-C in HF.

These sequences will provide a new tool to investigate the role of NPs and of their receptors under physiological and pathological conditions and their response to therapeutic interventions.

196

**SEQUENCING OF LONG PENTRAXIN-3 IN *SUS SCROFA***

M. Cabiati<sup>2</sup>, S. Savelli<sup>1</sup>, C. Caselli<sup>1</sup>, T. Prescimone<sup>1</sup>, D. Giannessi<sup>1</sup>, S. Del Ry<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa, Italy

<sup>2</sup>Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

**Background.** The prototypic long pentraxin, PTX-3, is a novel vascular inflammatory marker sharing similarities with the classic short pentraxin (C-reactive protein). PTX3 is rapidly produced and released by several cell types, in particular by mononuclear phagocytes, dendritic cells, fibroblasts, and endothelial cells, in response to local inflammation in the cardiovascular system. Recent studies have shown that plasma PTX-3 levels was increased in heart failure (HF) patients with advancing NYHA functional class while it was very low in normal conditions, but its exact role during HF pathogenetic mechanisms is not yet settled. Currently, no data are available about PTX-3 cardiac expression, in normal or pathological conditions, either in human or in large size animals. The pig constitutes a model largely used in experimental pathology where it has a central role in "in-vivo" clinical settings but its genome is not completely sequenced and PTX-3 gene is still lacking.

**Aim.** To sequence the PTX-3 in *Sus Scrofa* for future applications to molecular biology studies **Material and methods:** To sequence PTX-3 gene in *Sus Scrofa* was exploited the high homology between *Homo Sapiens* and *Sus Scrofa*. Pig PTX-3 mRNA was sequenced using polymerase chain reaction primers designed from human consensus sequences and the bands of interest were excised from the gel and processed with a gel extraction kit protocol. The DNA, obtained from different RT-PCR reactions, was sequenced with Sanger method.

**Results.** *Sus Scrofa* PTX-3 mRNA, 1-336 pb, was submitted to GenBank (accession number GQ 412351). The bands obtained from pig cardiac tissue shared a 95% sequence identity both with *Homo Sapiens* and *Mus Musculus*.

**Conclusions.** The knowledge of PTX-3 sequence can be an useful starting point for future studies devoted to better understand the specific role played by this molecule in the pathogenesis of HF. PTX-3 might be a potentially useful biomarker to predict prognosis as well as to detect inflammatory status in patients with CHF in order to develop new therapeutic approaches in the treatment of cardiac insufficiency.

197

**DETERMINATION OF CA125 AND HE4 IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS**C. Cosma<sup>1</sup>, C. Fiore<sup>2</sup>, D. Armanini<sup>2</sup>, D. Faggian<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Dept. of Laboratory Medicine, University of Padua, Italy<sup>2</sup>Dept. of Medical Surgical, U.O. Endocrinology, University of Padua, Italy

**Background.** A modest increase of CA125 in patients with endometriosis is not significant compared with the constant increase detect in reproductive organs tumour pathologies of reproductive organs. In few studies in literature were written about HE4 and endometriosis, but a very recent study differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometric cysts, rendering HE4 a promising biomarker for ovarian cancer, especially in association with CA125.

**Aim.** To analyse serum HE4 concentration together with a tumour marker CA125 in serum samples of women diagnosed with various types of endometriosis. The markers were measured before and after the surgery, may be value to the hypothesis that it may be possible to validate a predictive panel for endometriosis follow-up and for diagnostic confirmation.

**Method.** From December 2008 to June 2009, 15 patients suffering of endometriosis and 10 normal reference subjects were recruited for this study. In serum samples CA125 and HE4 were measured.

**Results.** Before and after surgery HE4 serum concentration did not show any significant variation in patients affected by endometriosis ( $27,34 \pm 5,51$  vs  $25,88 \pm 3,53$  pM) compared with reference subjects ( $26,70 \pm 7,80$  pM). CA125 serum levels show a significant variation in patients affected endometriosis before surgery ( $39,40 \pm 32,66$  UI/ml) versus to values out of same patients after surgery ( $25,21 \pm 17,98$  UI/ml) and both with control group ( $10,12 \pm 2,58$  UI/ml).

**Conclusion.** CA125 confirms his role in the early diagnosis and follow-up endometriosis panel: patients show that the CA125 value although lower than cancer values (between 40 and 80 UI/ml), is constantly slightly higher than normal cut-off of 35 U/L, and is declining rapidly within a month after the operation, to approximately a value ranging between 8 and 10 UI/ml. The CA125 values confirm that this marker could be used for the endometriosis diagnosis and follow-up. At contrary, HE4 recently indicated as marker of great usefulness in endometriosis ( $27,34 \pm 5,51$  when  $25,88 \pm 3,53$  pM) show values virtually identical in endometriosis patients before and after the operation and these values are not significantly different when compared with healthy control values.

198

**MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL CD133 IN LINEE CELLULARI CONTINUE UMANE TUMORALI DA PARTE DEL MICOPLASMA HYORINIS**E. Mariotti<sup>1</sup>, M. Gemei<sup>2</sup>, P. Mirabelli<sup>1</sup>, F. D'Alessio<sup>1</sup>, R. Di Noto<sup>1</sup>, L. Del Vecchio<sup>1</sup><sup>1</sup>CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli; Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli<sup>2</sup>CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli; European School of Molecular Medicine, Napoli

Le linee cellulari continue trovano impiego in diagnostica molecolare e nella ricerca biotecnologica-biomedica. L'apparente semplicità legata alla loro manipolazione può condurre a dati erronei. Il nostro lavoro dimostra che la contaminazione da micoplasma altera la corretta identificazione immuno-citometrica della frazione di cellule staminali tumorali CD133+. A tal fine abbiamo determinato la percentuale del subset CD133+ nelle linee cellulari continue umane di cancro del colon GEO, SW480 e HT-29, infettate da m.hyorinis e nelle stesse, a seguito della eradicazione. Infine, ci siamo proposti l'obiettivo di dimostrare la correlazione tra l'incremento di cellule CD133+ e la crescente carica micoplasmatica.

La contaminazione è stata rivelata mediante il saggio MycoAlert<sup>®</sup> e la coltura microbiologica su agar. La specie contaminante è stata determinata dall'analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione. L'eradicazione del micoplasma è stata effettuata mediante trattamento con gli antibiotici BM-ciclina I e II. I modelli cellulari sono stati, quindi, reinfettati con m.hyorinis. Infine, la percentuale di cellule CD133+ è stata ottenuta, in citometria a flusso, utilizzando l'anticorpo Anti-CD133 (AC133/1, Miltenyi).

In presenza del m.hyorinis abbiamo dimostrato una quota di cellule CD133+ pari al 5,7%, 52,5% e 92,5% nelle linee cellulari GEO, SW480 e HT-29 rispettivamente; essa è diminuita al 2,3%, 0,2% e 75,6% negli stessi modelli dopo l'eradicazione dell'infezione. Nella linea cellulare GEO abbiamo inoltre riprodotto l'infezione, dimostrando un incremento significativo della frazione CD133+ pari al 3,4%, 5,2%, 27,4% e 37,2% all'aumentare della carica di micoplasma (50, 100, 1000, 2000 CFU/ml a T21, T28, T49 e T56 rispettivamente), rispetto al controllo negativo. Abbiamo dimostrato che il m.hyorinis determina un forte incremento delle cellule CD133+ nelle linee cellulari studiate. Pertanto, l'assenza di micoplasma sia dai modelli cellulari, che dai reagenti impiegati nello studio delle cellule staminali tumorali, è un prerequisito necessario per evitare dati non riproducibili e falsi positivi.

**Bibliografia**

Ricci-Vitiani et al, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells, Nature 2007;445:111-15.

199

## 2-D DIGE E CARCINOMA RENALE

C. Salemi<sup>1</sup>, M. Beretta<sup>1</sup>, C. Bianchi<sup>2</sup>, S. Ferrero<sup>3</sup>, S. Casellato<sup>4</sup>, F. Magni<sup>2</sup>, C.R. Sarto<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Uni. di Medicina di Lab. Osp. di Desio, Milano

<sup>2</sup>Dip. di Med. Sper., Amb. e Biotec. Med. Uni. Milano-Bicocca, Monza (MI)

<sup>3</sup>Servizio di Anat. Pat. Osp. San Paolo, Milano

<sup>4</sup>Ist. di Urol., Osp. Maggiore IRCCS, Milano

**Introduzione.** La 2 Dimension Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) è una tecnica basata sulla marcatura dei campioni proteici prima della corsa elettroforetica con differenti fluorofori CyDyes e sull'utilizzo di uno standard interno che permette di minimizzare la variabilità sperimentale normalizzando i valori di abbondanza proteica (1). La successiva analisi statistica è eseguita da software specifici.

**Scopo.** Applicare la 2D-DIGE e l'analisi statistica multivariata (analisi delle componenti principali e clusterizzazione gerarchica) al fine di ricercare differenze nei livelli di espressione proteica tra campioni di carcinoma renale a cellule chiare (cc-RCC) ed omologhi tessuti renali normali. **Materiali e Metodi.** Sono stati studiati 20 pazienti affetti da cc-RCC sottoposti a nefrectomia. 50 mg di proteine derivanti dalle cellule epiteliali del tessuto tumorale e della corticale renale sana sono state separate con 2D-DIGE. Come standard interno è stato utilizzato un pool contenente uguali quantità di proteine derivate da tutti i campioni in studio.

**Risultati.** Dal confronto tra tessuto renale sano e cc-RCC, utilizzando il software Decyder 6.5, sono emerse 121 spots differentemente espresse con p-value<0.05, identificate in spettrometria di massa. La clusterizzazione gerarchica, ha evidenziato tre sottogruppi di campioni all'interno del cluster del RCC, ed una mappa tumorale con profilo d'espressione anomalo.

**Conclusioni.** L'identificazione di proteine differentemente espresse in RCC potrebbero fornire un valido aiuto per poter comprendere i dati clinici e i pathway alterati, al fine di individuare potenziali biomarcatori di neoplasia.

### Bibliografia

Unlü M, et al. Electrophoresis 1997;18:2071-7.

200

## APPROPRIATEZZA DELLE RICHIESTE DEL PSA FREE. VALUTAZIONE NELLA POPOLAZIONE FASANESE

R. Lovero<sup>1</sup>, M. Pepe<sup>1</sup>, A. Carucci<sup>1</sup>, A. Legrottaglie<sup>1</sup>, F. Epicoco<sup>1</sup>, A. Palmisano<sup>1</sup>, S. Tundo<sup>1</sup>, P. Ciola<sup>1</sup>, G. Saltarelli<sup>1</sup>, E. Vinci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. C. Lab. Analisi Cisternino Fasano Ostuni ASL Brinidisi

La diagnostica della patologia neoplastica prostatica si avvale di una accurata visita urologica, di indagini strumentali e di esami ematologici quali il dosaggio del PSA e del PSA free. Il PSA free è quella porzione di PSA non legata alla alfa 1-chimotripsina, pertanto è quella parte enzimaticamente attiva. Questo marcatore è più elevato nelle forme di ipertrofia prostatica benigna che nelle forme neoplastiche maligne. Recenti linee guida indicano come appropriate le richieste di dosaggio di PSA free solo se il PSA totale è superiore a 4 ng/ml.

**Scopo del lavoro.** Nella U.O. di Patologia Clinica di Fasano abbiamo valutato la percentuale di richieste appropriate secondo le linee guida per il dosaggio di PSA free nell'arco degli ultimi due anni.

**Materiali e Metodi.** A dicembre 2007 sono state distribuite le linee guida per la richiesta del dosaggio del PSA free all'utenza esterna. In conseguenza di ciò abbiamo valutato l'appropriatezza delle richieste di PSA free nell'anno 2007 rispetto al 2008 dopo la distribuzione delle linee guida.

**Risultati.** E' stato osservato un incremento delle richieste di PSA free pari al 15% nel 2008 rispetto al 2007, inoltre nel 2007 le richieste inappropriate per il dosaggio del PSA free erano pari al 70% mentre quelle appropriate erano del 30%. Nel 2008 le richieste inappropriate per il dosaggio del PSA free erano del 49% mentre appropriate del 51%. **Conclusioni.** L'incremento percentuale delle richieste appropriate per il dosaggio del PSA free nel 2008 trova ulteriore conferma anche dai dati in nostro possesso per il 2009. Ciò premesso appare opportuno, in considerazione dei dati ottenuti, continuare a percorrere la strada del confronto tra clinici e patologi clinici al fine di raggiungere una migliore qualità del servizio offerto ai pazienti.

### Bibliografia

NABC Practice Guidelines and Raccomandation for use of Tumor Markers in the clinic 2005

201

**CONFRONTO TRA DUE METODICHE PER IL DOSAGGIO DELLA CROMOGRANINA A: DATI PRELIMINARI**G. Barbina<sup>1</sup>, U. Qualizza<sup>1</sup>, A. Colatutto<sup>1</sup>, R. Ganzini<sup>1</sup>, B. Marcon<sup>1</sup>, E. Tonutti<sup>1</sup>, P. Sala<sup>1</sup>, F. Curcio<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Diagnostica di laboratorio, Az. Ospedaliero-Universitaria "S. Maria della Misericordia", Udine

Scopo del lavoro. La Cromogranina A (CGA) è una glicoproteina acida idrosolubile di 439 A.A. che, dosata nel sangue, si è dimostrata un utile marcatore tumorale, sensibile e specifico, nel monitoraggio di neoplasie di origine neuroendocrina. Scopo del presente lavoro è il confronto tra una metodica interamente manuale radioimmunologica (RIA) ed una metodica immunoenzimatica (EIA) automatizzata.

Materiali e Metodi. Sono stati raccolti e congelati a -20°C fino all'analisi 103 campioni di siero e plasma di pazienti afferenti al nostro laboratorio. Tali campioni sono stati dosati in duplicato con la metodica RIA (CGA-RIACT CIS bio International, F91192 GIF – SUR-YVETTE CEDEX, France) e con quella EIA (DAKO, DK-2600 Glostrup, Denmark).

La metodica EIA è stata automatizzata sullo strumento DSX SYSTEM della Ditta Dynex International Pty Ltd 3 Margaret St Parkdale VIC 3195.

Risultati. Una prima analisi dei dati mostra un intervallo di concentrazione che va da 5.5 a 3304.0 ng/mL per la metodica RIA e da 9.9 a 706.6 U/L per la metodica EIA. Le medie rispettive erano 74.3 ng/ml e 269.4 U/L. La correlazione risulta buona:  $R = 0.76$ . Assumendo come cut-off di positività i rispettivi range consigliati dalle ditte abbiamo rilevato una concordanza nel 93.2% dei dati. La precisione analitica totale ha mostrato un CV di 5.6% per il metodo RIA e si attestava su 4.64% in immunoenzimatica.

Discussione e Conclusioni. La comparazione delle due metodiche, pur con caratteristiche analitiche così diverse, risulta buona sia in termini statistici che clinici. I bassi CV riscontrati indicano che i prodotti offrono garanzia di efficacia analitica. La nostra esperienza suggerisce una superiorità della metodica EIA in quanto, grazie alla eliminazione della fase manuale, aumenta la velocità di analisi in completa automazione ed infine, utilizzando reagenti non radioattivi, è accessibile anche a laboratori non attrezzati in tal senso.

**Bibliografia**

1. Nobels FRE, Kwekkeboom DJ, Boiullon R & Lamberts SW. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumors. *European Journal of clinical investigation* 1998;28:431-40.

202

**PERFORMANCE OF THE AUTOMATED AND RAPID CYFRA 21-1 ROCHE ON THE ROCHE MODULAR**G.L. Salvagno<sup>1</sup>, O. Ruzzenente<sup>1</sup>, C. Gherardini<sup>1</sup>, M. Montagnana<sup>1</sup>, G. Brocco<sup>1</sup>, G. Lippi<sup>1</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup><sup>1</sup>Sezione di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Osp. Policlinico G.B. Rossi, Verona, Italy

Background. Cytokeratins and other intermediate filaments of the cell are present in various normal and pathologic tissues. Currently, at least 20 different cytokeratins have been described by immunohistochemical studies. The CYFRA 21-1 assay was developed to measure a soluble fragment of cytokeratin 19 in serum. The introduction of simple and automated assays for this parameter is advisable, and several automated methods are now becoming commercially available, although most of these are not suited for most clinical laboratories.

Aim. The aim of this study was to compare the analytical performances of the new Electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA" CYFRA 21.1 for the Roche/Hitachi Modular System E with a reference immunoradiometric assay (IRMA), based on the two-site sandwich method (ELSA-CYFRA 21-1, Fujirebio Diagnostics).

Methods. Imprecision was tested on the Roche CYFRA 21.1 and two serum aliquots of patients' samples were assayed simultaneously with both methods. Results. The within run coefficients of variations of Roche CYFRA 21.1 at low (3.19 ng/mL) and high (10.02 ng/mL) concentrations were 4.3% and 1.8%, respectively. The assay was linear in a wide range of CYFRA concentrations, comprised between 1.2 and 78.4 ng/mL, as confirmed by linear regression analysis ( $y = 0.98x + 1.41$ ) and correlation coefficient ( $r=1.00$ ,  $p<0.001$ ). Results of serum samples ( $n=113$ ) were compared with those of the reference commercial IRMA method. The median values (2.5-97.5 percentiles) of the samples were: 2.0 ng/mL (0.4-23.8 ng/mL) for IRMA, 2.1 ng/mL (0.6-23.5 ng/mL) for ROCHE. The nonparametric regression according to the method of Passing & Bablok and the relative Spearman's correlation coefficient showed excellent performance for the Roche CYFRA 21.1 (Roche CYFRA 21.1 = 1.02 x IRMA - 0.04;  $r = 0.999$ ,  $p<0.001$ ). Conclusion. The analytical performance and the technical features of new Roche CYFRA 21.1 assay make it a suitable assay for the rapid quantification of CYFRA 21.1 in clinical laboratories.

**Reference**

Yi Y, Li B, Wang Z, Sun H, Gong H, Zhang Z. CYFRA21-1 and CEA are useful markers for predicting the sensitivity to chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers*. 2009 Aug 18. [Epub ahead of print].

203

**REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION  
QUANTIFICATION OF FREE DNA IN SERUM OF  
PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER AND  
ADENOMATOUS POLYPS**

E. Danese<sup>1</sup>, M. Montagnana<sup>1</sup>, A. Minicozzi<sup>2</sup>, G. De Matteis<sup>1</sup>, G.L. Salvagno<sup>1</sup>, M. Gelati<sup>1</sup>, C. Cordiano<sup>2</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>, G. Lippi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Verona

<sup>2</sup>Sez. di Chirurgia d'Urgenza, Dip. di Scienze Anestesiologiche e Chirurgiche Specialistiche, Verona

**Aim.** Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent cause of cancer death worldwide. The carcinoembryonic antigen (CEA) is considered the gold standard marker for CRC to date. Nevertheless, its evaluation is not recommended for screening healthy subjects since increased concentrations only occur in 5% to 40% of CRC. These data highlight the importance to develop new and more sensitive biomarkers. Recently, the evaluation of cell-free DNA as diagnostic tools to identify cancer has been investigated. Aim of this work was to investigate whether circulating DNA in blood of CRC patients could be used as an additional marker for diagnosis.

**Methods.** 98 patients with CRC were included in the study, along with 10 patients affected by colorectal adenomatous polyps and 26 controls. Serum cell-free DNA was extracted using the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). DNA concentrations were measured by Real Time TaqMan-PCR assay. We chose primers and Vic-labeled-probes to specifically amplify the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene. Each reaction was performed in duplicate and a calibration curve was made using serial dilution of human genomic DNA. Results were compared by Mann-Whitney U test and Chi square analysis, when appropriate. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

**Results.** Serum DNA concentrations were significantly higher in CRC patients compared with both patients with polyps (median value 125.0 vs. 30.5 ng/mL,  $p = 0.0005$ ) and controls (125.0 vs. 14.0 ng/mL,  $p < 0.0001$ ). The Receiver Operating Characteristics (ROC) curve analysis on healthy controls and patients with CRC revealed an Area Under the Curve (AUC) of 0.95 serum free DNA, with sensitivity and specificity of 100% and 79.6% respectively (cut-off of 52.5 ng/mL). Although CEA was above the cutoff in only 37/98 (37.8%) CRC patients, serum free DNA displayed values above the threshold (52.5 ng/mL) in 78/98 (79.6%) ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion.** Our preliminary data confirm that serum DNA levels are significantly increased in CRC patients, so that this marker might be useful for identifying high risk individuals.

**Reference**

Gormally E, et al. Mutation Research 2007;635:105-117.

204

**USO DELLE LINEE GUIDA NABC PER RIDURRE  
L'ERRORE DI INAPPROPRIATEZZA DELLE  
RICHIESTE DEI MARCATORI NEOPLASTICI.  
NOSTRA ESPERIENZA**

R. Lovero<sup>1</sup>, M. Pepe<sup>1</sup>, G. Saltarelli<sup>2</sup>, A. Legrottaglie<sup>1</sup>, F. Epicoco<sup>1</sup>, P. Ciola<sup>1</sup>, C. Saracino<sup>1</sup>, A. Carucci<sup>1</sup>, S. Tundo<sup>1</sup>, E. Vinci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. C. Lab. di Analisi Fasano Ostuni Cisternino (BR)

<sup>2</sup>Servizio di Igiene e Sanità Pubblica ASL Brindisi

Il continuo incremento delle richieste di marcatori tumorali, da parte dell'utenza esterna, è nella maggior parte dei casi non supportata da una giustificazione clinico-diagnostica. La richiesta del dosaggio dei marcatori tumorali risulta appropriata non solo per la specificità d'organo ma anche per la fase del processo di cura del paziente. A tale proposito le recenti linee guida NABC considerano appropriate le richieste con un singolo marcatore neoplastico quando ci sia un sospetto o diagnosi certa di tumore.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'uso delle linee guida NABC, distribuite ai clinici, al fine di ridurre l'inappropriatezza delle richieste.

**Materiali e Metodi.** A dicembre 2007 sono state inviate ai clinici le linee guida NABC. È stata valutata l'appropriatezza delle richieste dei seguenti marcatori: AFP, CEA, CA 19.9, CA 125, CA15.3. Su questi marcatori è stato calcolato l'eventuale incremento delle richieste dal 2007 al 2008 e si è valutata l'appropriatezza delle stesse. Le richieste, con diagnosi di neoplasia, con un unico marcatore sono state considerate appropriate mentre non appropriate quelle con più di due marcatori.

**Risultati.** L'incremento annuo dal 2007 al 2008 delle richieste per singolo marcatore è stato di circa 15%. La riduzione dell'inappropriatezza per quanto riguarda le richieste per AFP è stata pari al 15%; per CEA è stata pari a 8%; per CA19.9 è stata pari a 6%; per CA125 è stata pari a 7%; per CA15.3 è stata pari a 8%.

**Conclusioni.** L'efficacia dell'azione intrapresa ha portato ad un più corretto utilizzo dei marcatori tumorali da parte dei clinici con un decremento delle richieste inappropriate. Ciò premesso sarebbe auspicabile un maggior coinvolgimento dei clinici al fine di garantire non soltanto un miglior management dei pazienti ma anche una riduzione della spesa sanitaria.

**Bibliografia**

NABC Practice Guidelines and Recommendation for use of Tumor Markers in the clinic 2005.

205

### CYTOKINE EXPRESSION PROFILE IN SERUM AND CYTOSOL FROM NODE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS: ASSOCIATION WITH ESTROGEN RECEPTOR STATUS

E. Bucca<sup>1</sup>, E. Squarcina<sup>1</sup>, A. Fabricio<sup>1</sup>, A. Leon<sup>1</sup>, E. Da Ros<sup>1</sup>, M. Gion<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre for the Study of Biological Markers of Malignancy, IOV IRCCS/Association ABO for the Application of Biotechnologies in Oncology, Regional Hospital, Azienda ULSS 12 Veneziana, Venice, Italy

<sup>2</sup>Centre for the Study of Biological Markers of Malignancy, Lab. of Analysis, ULSS 12 Veneziana, Venice, Italy

**Aim.** Cytokines are emerging as factors potentially involved in breast carcinogenesis. Cytokines are more abundant in breast carcinoma than in normal breast tissue (1) and there are significantly higher cytokine values in serum of breast cancer patients in comparison with healthy subjects (2). Here we compared the cytokine profile in serum and cytosol of breast cancer patients and the association between cytokine levels and prognostic tissue factors such as estrogen receptors (ER).

**Methods.** Paired tumour biopsies and serum samples were collected from 106 node-negative primary breast cancer patients prior to adjuvant therapy. Cytosolic fractions were prepared from frozen biopsies. Cytokines were simultaneously measured by using the Bio-plex human cytokine 12-plex panel (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17, G-CSF, IFN- $\gamma$ , RANTES, TNF- $\alpha$  and VEGF; BIO-RAD). ER expression in cytosol was determined by ligand binding assay (cut off = 10 fmol/mg protein). **Results.** The cytokines most expressed in serum were RANTES, VEGF and IFN- $\gamma$ , whereas in cytosol the most expressed were VEGF, IL-10 and RANTES. IL-8 and IL-6 levels in cytosol were associated with ER status. In fact, cytosol levels of these cytokines were higher in ER-negative than in ER-positive patients (IL-8: median 51.41 vs 6.58 pg/mg protein,  $p < 0.001$ ; IL-6: median 12.49 vs 2.57 pg/mg protein,  $p < 0.01$ ). Interestingly, we observed a significant positive correlation between cytosol and serum IL-8 levels (Spearman coefficient correlation = 0.25;  $p < 0.05$ ). Moreover, a higher positive significant correlation was found between cytosol and serum IL-8 levels in ER-negative patients (Spearman coefficient correlation = 0.63;  $p < 0.01$ ). **Conclusion.** ER-positive and ER-negative patients seem to show different patterns of cytokine expression with higher tissue cytokine levels in ER-negative tumours. Moreover, serum IL-8 levels seem to reflect the cytokine content in breast cancer tissue. It remains to be tested whether IL-8 might be a prognostic factor to be combined with ER in the management of node-negative breast cancer patients.

#### References

1. Chavey et al. Breast Cancer Res. 9 (1): R15, 2007.
2. Lyon et al. Nurs Res. 57 (1): 51-8, 2008.

206

### LEVEL OF HAEMOGLOBIN IN FAECAL SAMPLINGS OVER THE SEASONS IN THE COLORECTAL CANCER SCREENING PROGRAMME OF FLORENCE

T. Rubeca<sup>1</sup>, L. Ventura<sup>3</sup>, M. Confortini<sup>1</sup>, G. Grazzini<sup>2</sup>, S. Rapi<sup>4</sup>, M. Zappa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Citologia Analitica e Biomolecolare, Ist. per lo Studio e la Prevenzione Oncologica-ISPO, Firenze

<sup>2</sup>Prevenzione Secondaria Screening, Ist. per lo Studio e la Prevenzione Oncologica-SPO, Firenze

<sup>3</sup>Epidemiologia Clinica e Descrittiva, Ist. per lo Studio e la Prevenzione Oncologica-ISPO, Firenze

<sup>4</sup>Lab. Generale, Dip. Lab. A.O.U. Careggi, Firenze

Faecal occult blood testing (FOBT)-based screening has been proven effective in reducing mortality from colorectal cancer. In Italy latex agglutination test (LAT) has been adopted as 1-day testing in screening programmes, using a positivity threshold of 100ng/Hb (1). We evaluated the variations in Hb concentration in faecal samplings over the seasons, using analytical data from the screening programme of Florence.

**Material and Methods.** We analyzed Hb levels in about 200.000 FOBTs performed from 2001 to 2008, according to seasons and to the average ambient temperatures (AAT), obtained from the Laboratory for Environmental Monitoring and Modelling of Florence. LAT assay (OC-Hemodia, Eiken, Tokyo, distributed by Medical System, Italy) was developed by means of the OC-Sensor micro instrument. In order to evaluate the significance of the concentration of haemoglobin over the seasons and AAT, we carried out non parametric statistical tests (Kruskal-Wallis test for equality of rank and a test for equality of median). We also constructed a regression model adjusted for sex, age, season and number of exams performed by the subjects (first exam or repeated exam).

**Results.** Mean seasonal Hb levels in FOBT samplings (in ng/ml) were: spring=21,7; summer=19,5; autumn=22,7; winter=24,1 ( $p < .01$ ). Mean Hb levels (in ng/ml) according to the average ambient temperature: AAT>20°C=20; AAT>10°C and <20°C=22,5; AAT≤10°C= 23,5 ( $p < .01$ ). The regression coefficient for the summer was -4.4 ( $p < .01$ ) respect to the winter. Adjusted for age, gender and exam (first or subsequent) the probability to be FOBT positive was 0.86 (95% CI 0.81-0.92) at AAT>20°C as compared to AAT>10°.

**Discussion.** Our results showed a significant decrement in HB concentration during the summer and increasing the ambient temperature. Therefore, the probability to be positive at FOBT test was 20% lower in the summer respect to the winter. In our screening programme, returned tests are stored at 4° C as soon as possible and storage at room temperature is usually limited to the transportation time. These results could have important consequences on the organization of FOBT-based screening programmes.

#### Reference

1. Zorzi M et al. Screening for colorectal cancer in Italy:2006 Survey. Epidemiol Prev 2008 Mar-Apr;32(2 Suppl 1):55-68.

207

### REAL-TIME PCR PROFILING OF HEPATOCYTE AND INFILTRATING CELL GENE EXPRESSION FOR THE MOLECULAR CLASSIFICATION OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC)

E. Cariani<sup>1</sup>, C. Rota<sup>1</sup>, A. Zerbini<sup>2</sup>, T. Trenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica, Tossicologia e Diagnostica Avanzata, Nuovo Ospedale S. Agostino-Estense, Modena

<sup>2</sup>Lab. di Immunopatologia, Azienda Ospedaliera di Parma

HCC, the third leading cause of cancer-related death worldwide, is a multifactorial disease, and only a minority of patients is eligible to potentially curative treatments. Due to HCC heterogeneity, currently available staging systems are not completely accurate for prognostic evaluation and treatment stratification. Identification of HCC biological background might improve classification and provide targets for personalized molecular therapies. Combined analysis of infiltrating cells mRNA profile may better characterize tumor environment.

Technical difficulties and little overlap among results have so far hampered the clinical use of high-throughput expression profiling. The availability of simplified profiling tools might disclose new perspectives for diagnostic use of molecular signatures in clinical laboratories.

In this study, paired HCC and surrounding tissues (NT) obtained from 21 patients were analyzed by a real-time (RT)-PCR-based profile including fetal liver genes (alpha fetoprotein (AFP) and IGF-2), progenitor cell markers (cytokeratin 7 (CK7), vimentin (VIM), EpCAM), and immune response genes (PD1, PDL1, FoxP3, granzyme-B (GZ-B), CD8, gamma interferon ( $\gamma$ IFN), IL6).

In HCCs, AFP, IGF-2, EpCAM and VIM mRNAs were significantly associated with each other and with PD1 and GZ-B. In NT, PD1 mRNA was associated with AFP, CK7, VIM and EpCAM. The contribution of genes to the 5 profiles (P) detected by hierarchical clustering was identified by principal component analysis. Decreased expression of all mRNAs was detected in P1, whereas P2 expressed both fetal-progenitor (VIM, AFP, EpCAM) and immune cell mRNAs (PD1, GZ-B,  $\gamma$ IFN) except FoxP3 and PDL1. P3 was characterized by immune response mRNAs; P4 included AFP, IGF-2 and FoxP3, but not CK7 and EpCAM; P5 expressed IGF-2, CK7, PD1.

NT profiles did not match the ones of corresponding HCCs but clustered in 2 groups: the former included both fetal-progenitor and immune response mRNAs except FoxP3 and  $\gamma$ IFN, that characterized the latter profile.

In conclusion, molecular profiling through a simplified mRNA signature including hepatocyte and immune response markers detected specific HCC classes consistent with previous data and potentially useful to evaluate clinical outcome and therapeutic indications.

208

### SERUM AND TISSUE EXPRESSION OF HER-2/NEU IN MATCHED SAMPLES FROM PATIENTS WITH PRIMARY BREAST CANCER

E. Bucca<sup>1</sup>, S. Michilin<sup>1</sup>, M. Zancan<sup>1</sup>, A. Fabricio<sup>1</sup>, R. Dittadi<sup>4</sup>, A. Scapinello<sup>2</sup>, C. Ceccarelli<sup>3</sup>, L. Peloso<sup>1</sup>, M. Gion<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Associazione ABO per l'Applicazione delle Biotecnologie in Oncologia-CRIBT IOV-IRCCS, AULSS 12-Venezia, Italy

<sup>2</sup>U.O. Anatomia Patologica, AULSS 8-Castelfranco V.to-Regione Veneto, Italy

<sup>3</sup>Dip. Clinico di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche, Università di Bologna

<sup>4</sup>U.O. Lab. Analisi P.O. Mestre, AULSS 12, Venezia, Italy

<sup>5</sup>Centro Regionale Indicatori Biochimici di Tumore, Lab. Analisi, AULSS 12-Venezia, Italy

**Aim.** HER-2/neu is overexpressed in 30% of breast cancer patients and its presence is associated with poor prognosis and metastatic progression (1). The extracellular domain (ECD) of HER-2/neu can be cleaved from the cell surface and shed into the blood as a 105kDa protein. It has not been yet clarified whether circulating ECD can be considered a surrogate marker of tissue expression in breast cancer patients and if it can be used to identify patients who will benefit from target therapies. This study investigated whether a correlation exists between serum levels of extracellular domain of HER-2/neu receptor (ECD) and the difference between intracellular and extracellular HER-2/neu domain expression in tissue of 102 consecutive primary breast cancer patients.

**Methods.** Serum levels of ECD were measured by the automated immunoassay (Bayer Diagnostics) and tumor tissue expression was analyzed by immunohistochemistry using Tab250 (Zymed) e CBE1 (Novocastra) in association and CB11 (Zymed) antibodies, against the extracellular and intracellular receptor domains, respectively.

**Results.** Median ECD level was 9.35 ng/mL and 5.9% patients displayed ECD levels above the cut-off value of 15 ng/mL. When using a cut-off value of 13 ng/mL (2), this percentage increases to 12.7%. HER-2/neu intracellular and extracellular domain was overexpressed in tumor tissue of 19.6% and 6.9% of patients, respectively. However, any correlation was found between serum ECD levels and the differential tissue expression of the intracellular and extracellular domains ( $p=0.615$ ).

**Conclusions.** Even considering that the measurement of circulating ECD is easy, relatively inexpensive and samples are readily obtained, the present findings do not support the putative role of circulating ECD as a surrogate marker of HER-2/neu tissue expression in primary breast cancer.

#### References

1. Carney et al. Clinical Chemistry 49:10; 1579-1598 (2003)
2. Dittadi et al, Int J Biol Markers 16:4; 255-61 (2001)

209

### THE PANCREATIC CANCER (PC) DERIVED S100A8 N-TERMINAL PEPTIDE (NT-S100A8) AUGMENTS INTRACELLULAR $Ca^{2+}$ ( $[Ca^{2+}]_i$ ) OSCILLATIONS AND INSULIN RELEASE

A. Padoan<sup>1</sup>, E. Greco<sup>1</sup>, P. Fogar<sup>2</sup>, M. Scorzetto<sup>3</sup>, E. Fadi<sup>1</sup>, A. Valerio<sup>4</sup>, D. Bozzato<sup>1</sup>, F. Navaglia<sup>5</sup>, C. Zambon<sup>2</sup>, S. Pedrazzoli<sup>2</sup>, M. Plebani<sup>6</sup>, D. Basso<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies, Univ. of Padova

<sup>2</sup>Dept. of Med. and Surgical Sciences, Univ. of Padova

<sup>3</sup>Dept. of Anatomy and Physiology, Univ. of Padova

<sup>4</sup>Dept. of Clinical and Experimental Med. Univ. of Padova

<sup>5</sup>Dept. of Laboratory Medicine, Univ. of Padova

<sup>6</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies and Dept. of Laboratory Medicine, Univ. of Padova

Background. NT-S100A8 was isolated by us from PC tissue. We verified whether NT-S100A8 alters: 1. PC cell growth and invasion; 2. insulin release and  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations of insulin secreting cells. Methods. BxPC3, Capan1, MiaPaCa2, Panc1 (human PC cell lines);  $\beta$ -TC-6 (mouse insulinoma cell line). PC cell growth (Trypan blue) and invasion (Matrigel) were assessed in the absence (control) or presence of 50, 200 and 500 nM NT-S100A8. In control and NT-S100A8 stimulated  $\beta$ -TC-6 culture medium, insulin (RIA) and  $Ca^{2+}$  (Gas Analyzer) were measured at 2,3,5,10,15,30 and 60 min.  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations of control, 50 and 500 nM NT-S100A8 stimulated  $\beta$ -TC-6 was monitored (Fluo-4, epifluorescence microscopy) for three min. Results. 500 nM NT-S100A8 stimulated BxPC3 cell growth only ( $F=3.7, p<0.05$ ). NT-S100A8 dose dependently enhanced Capan1 ( $Chi^2=16.9, p<0.01$ ), reduced MiaPaCa2 ( $Chi^2=24.7, p<0.001$ ) and Panc1 ( $Chi^2=16.0, p<0.05$ ) invasion. 500 nM NT-S100A8 induced a rapid (2 min) and persistent (further 3 min) insulin release ( $F=3.01, p<0.05$ ). The same dosage enhanced  $\beta$ -TC-6  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations both after one ( $F=6.05, p<0.01$ ) or two min. ( $F=7.42, p<0.01$ ). The mean difference $\pm$ SE between the number of  $[Ca^{2+}]_i$  spikes recorded one minute after and one minute preceding NT-S100A8 stimulation were:  $-0.24\pm 0.6$ ,  $1.16\pm 0.6$  and  $3.4\pm 0.6$  spikes/min for control, 50 and 500 nM stimulated cells. In the medium  $[Ca^{2+}]_i$  significantly decreased with respect to control cells ( $F=6.3, p<0.01$ ).

Conclusions. 1. NT-S100A8 exerts a mild effect on PC cell growth, while it both enhances or reduces PC cell invasion, responses being cell line specific; 2. NT-S100A8 enhances  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and insulin release, probably by inducing  $Ca^{2+}$  influx from the extracellular space.

#### Reference

Kitsou-Mylyona I et al. A role for the extracellular calcium-sensing receptor in cell-cell communication in pancreatic islets of Langerhans. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:557-66.

210

### DIFFERENTIAL URINARY EXOSOME COMPOSITION AS POTENTIAL SOURCE OF RCC BIOMARKERS

M. Pitto<sup>1</sup>, L. Morosi<sup>1</sup>, A.G. Sanarico<sup>1</sup>, M. Rota<sup>1</sup>, R. Perego<sup>1</sup>, F. Magni<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>1</sup>, G. Zanetti<sup>2</sup>, S. Ferrero<sup>3</sup>, F. Raimondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Exp. Medicine, Univ. Milano-Bicocca, Monza, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Urology, Hospital Maggiore IRCCS, Univ. Milano, Milano, Italy

<sup>3</sup>Dept. of Medicine Surgery and Dentistry, Pathological Anatomy, S. Paolo Hospital, Univ. Milano, Milano, Italy

Exosomes are nanometer sized (50-100 nm) membrane vesicles released by most living cells. Secretion of exosomes by tumor cells is enhanced, suggesting their involvement in cancer progression. Urinary exosomes have been shown to derive from every epithelial cell type facing the urinary space. For this reason they are considered an important source of urinary proteins and a promising starting material for biomarker discovery (1). Clear cell renal carcinomas (RCC) is representing about 3% of all kidney cancers. No biomarkers for diagnosis of RCC or for post-surgery monitoring are yet available.

We studied the composition of the exosomal fractions prepared from control and RCC patient urines in order to look for differences in protein and/or lipid composition to be exploited as potential tumor marker.

Exosomes were isolated from about 50 ml of urines collected from 14 control healthy subjects and 16 RCC patients, matched for sex and age, by ultracentrifugation. Protein composition was addressed by SDS-PAGE, followed by CBB staining or WB with antibodies against specific membrane proteins. Lipid composition was assessed after extraction and partitioning: cholesterol and phospholipids were analyzed by TLC.

Results show that some membrane proteins display differential amount in RCC patient urine exosomes. In particular Aquaporin-1, and P-Glycoprotein, whose expression has been reported to be downregulated in RCC tissues, compared to healthy cortex, are shown to have reduced content in patient exosomes. On the contrary, Matrix metallo-protease 9 and Carbonic Anhydrase IX, which were reported as overexpressed in RCC, result more abundant. A different behavior is displayed by the Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer: although it is shown increased in the membrane fraction of RCC tissues, its content in patient exosomes is much lower than in control ones. Finally, we started the analysis of exosomal lipid composition and preliminary results show that the overall lipid profile is not significantly different between control and patient urinary exosomes.

In conclusion our work suggests that proteomics and lipidomics of urinary exosomes show potential for the identification of selective renal biomarkers.

#### Reference

1. Hoorn EJ et al. *Nephrology* 2005;10:283-90.

211

### HELICOBACTER PYLORI EPIYA-C MOTIFS ARE MAIN DETERMINANTS OF INTESTINAL METAPLASIA AND GASTRIC MUCOSA ATROPHY

D. Bozzato<sup>1</sup>, C.F. Zambon<sup>2</sup>, D. Basso<sup>2</sup>, G. Guariso<sup>3</sup>, F. Farinati<sup>4</sup>, S. Schiavon<sup>2</sup>, F. Navaglia<sup>2</sup>, P. Fogar<sup>5</sup>, E. Greco<sup>1</sup>, E. Fadi<sup>1</sup>, M. Ruggè<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies, Univ. of Padova

<sup>2</sup>Dept. of Laboratory Medicine, Univ. of Padova

<sup>3</sup>Dept. Paediatrics, Univ. of Padova

<sup>4</sup>Dept. Gastroenterological Sciences, Univ. of Padova

<sup>5</sup>Dept. Medical and Surgical Sciences, Univ. of Padova

<sup>6</sup>Dept. of Diagnostic Sciences and Special Therapies, Dept. of Laboratory Medicine, Univ. of Padova

**Background.** Western *H. pylori* cagA+ strains with 2 or more EPIYA-C motifs enhance gastric cancer risk. We verified whether antrum and corpus *H. pylori* virulence genes (*vacA* s, i and m polymorphisms, *cagA* and EPIYA-C motifs or *babA2*) were associated with the following histological parameters: antrum and corpus inflammation, activity, *H. pylori* colonization grades, intestinal metaplasia (IM) and/or atrophy. **Methods.** we studied 191 *H. pylori* infected patients: 66 cagA- (54 gastritis, 12 duodenal ulcer) and 125 cagA+ (85 gastritis, 40 duodenal ulcer). The histological parameters considered were: antrum and corpus inflammation, activity and *H. pylori* colonization grades and presence or absence of IM and atrophy. The following *H. pylori* virulence genes were PCR analysed in clinical isolates: *vacA* s, i and m polymorphisms, *cagA* EPIYA-C and *babA2* status. Serum pepsinogen A/pepsinogen C ratio (PGA/PGC) were assayed (ELISA) as a biochemical index of multifocal or corpus atrophy.

**Results.** Both antrum and corpus inflammation and activity correlated with *vacA* s1 and i1 alleles and with *cagA* EPIYA-C motifs ( $p < 0.05$ ); corpus inflammation and activity also correlated with *vacA* m1 allele ( $p < 0.05$ ). IM correlated with s1 ( $p < 0.001$ ), i1 ( $p < 0.001$ ) and m1 *vacA* ( $p < 0.001$ ), with EPIYA-C motifs ( $p < 0.001$ ), with *babA2* ( $p < 0.01$ ), with corpus inflammation ( $p < 0.05$ ) and *H. pylori* colonization grade ( $p < 0.005$ ). Only EPIYA-C correlated with IM at logistic regression analysis ( $p < 0.05$ ). Since few patients had chronic atrophic gastritis, we biochemically defined the presence (BA) or absence (BN) of multifocal atrophy on the basis of PGA/PGC ratio ( $\leq$  or  $> 4.7$ ). BA correlated with s1 *vacA* ( $p < 0.05$ ), *babA2* ( $p < 0.005$ ) and EPIYA-C motifs ( $p < 0.01$ ). Only EPIYA-C was associated with BA after logistic regression analysis ( $p < 0.05$ ; 1 EPIYA-C: OR=1.7; 95% CI=0.3-9; two or more EPIYA-C: OR=4.7; 95% CI=1.07-21.18).

**Conclusions.** Among western *H. pylori* strains virulence determinants, the number of EPIYA-C motifs is mainly associated with IM and biochemical signs of atrophy fitting with an early involvement of multiple EPIYA-C in multistep gastric carcinogenesis.

#### Reference

Basso D et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135(1):91-9.

212

### LO STRESS OSSIDATIVO E LA FOSFORILAZIONE DI ERK COME PARAMETRI PREDITTIVI DI RISPOSTA IN PAZIENTI CON HCC TRATTATI CON SORAFENIB ED OCTREOTIDE LAR: NUOVE TECNICHE DIAGNOSTICHE

M. Caraglia<sup>1</sup>, S. Naviglio<sup>1</sup>, G. Giuberti<sup>1</sup>, P. Stiuso<sup>1</sup>, L. Montella<sup>2</sup>, R. Addeo<sup>2</sup>, S. Del Prete<sup>2</sup>, A. Abbruzzese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

<sup>2</sup>Unità Operativa di Oncologia, Ospedale di Frattamaggiore, ASL Napoli 2 Nord

Abbiamo arruolato 50 pazienti con epatocarcinoma (HCC) non eleggibili per trattamenti locali. Tali pazienti sono stati sottoposti a terapia medica con sorafenib (un inibitore di raf chinasi e di VEGF-R) e octreotide LAR. Sono stati effettuati prelievi di sieri e di cellule mononucleate periferiche (MNPC) al tempo 0 e durante il trattamento. Sono state raggiunte 5 risposte parziali (10%) e 33 stazionarietà di malattia (66%). Abbiamo valutato sui linfociti di 46 pazienti i livelli di O2- dopo marcatura con idroetidina e successiva analisi dei dati al FACS. Abbiamo rilevato che nei pazienti responsivi vi è un graduale decremento della intensità di fluorescenza media (MFI) che al tempo 0 è  $50 \pm 10$  e dopo 3 settimane di trattamento è circa  $25 \pm 5$ . D'altra parte nei pazienti non responsivi è stato registrato un incremento dello stress ossidativo. Inoltre tali effetti avvenivano in parallelo con la modulazione dell'attività sierica della superossido dismutasi (SOD). Infatti non vi erano variazioni significative della SOD nei pazienti non responsivi mentre quest'ultima aumentava di ben 3 volte in quelli responsivi dopo 3 settimane di trattamento. L'ossido nitrico (NO) sierico ad elevati livelli può favorire la morte delle cellule neoplastiche e antagonizzare la farmaco-resistenza. Abbiamo riscontrato un incremento medio del 50% nei pazienti responsivi al trattamento mentre nei non responsivi i suoi livelli non cambiavano in maniera significativa. Il sorafenib è un inibitore di raf chinasi i cui substrati terminali a valle sono Erk-1 e 2. Pertanto abbiamo valutato i livelli di fosforilazione di Erk-1/2 nei linfociti dei pazienti. La valutazione della fosforilazione di Erk-1/2 al FACS era del tutto sovrapponibile alla determinazione con metodica di Western Blotting. Abbiamo rilevato un incremento progressivo dell'attività di Erk-1/2 nei pazienti non responsivi con una MFI di  $25 \pm 5$  al tempo 0 e di  $45 \pm 4$  dopo 3 settimane di trattamento mentre nei pazienti responsivi era rilevata una riduzione significativa da una MFI di  $28 \pm 4$  al tempo 0 ad una MFI di  $15 \pm 2$  dopo 3 settimane di trattamento. Pertanto la valutazione dello stress ossidativo e dell'attività di Erk-1/2 sono validi fattori predittivi di risposta nell'HCC.

213

**NICOTINAMIDE N-METHYLTRANSFERASE: A PROMISING MARKER FOR ORAL CANCER**

V. Pozzi<sup>1</sup>, A. Santarelli<sup>2</sup>, C. Rubini<sup>3</sup>, M. Tomasetti<sup>4</sup>, E. Renzi<sup>1</sup>, D. Sartini<sup>1</sup>, R. Rocchetti<sup>2</sup>, L. Lo Muzio<sup>5</sup>, M. Emanuelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica, Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>3</sup>Dip. di Neuroscienze, Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>4</sup>Dip. di Patologia Molecolare e Terapie Innovative, Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>5</sup>Dip. di Scienze Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity, representing 90 % of all oral cancers. Despite the advances in diagnoses, surgical techniques, general patient care, and adjuvant therapies, the mortality rate of OSCC has shown little improvement over the last three decades and the overall five-year survival of these patients remains less than 50%. Delayed detection is likely to be a primary reason for the high mortality rate of oral cancer patients, and this supports the imperative need for sensitive biomarkers to improve early detection of this malignancy.

In the present study, we focused on the expression of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT), which catalyses the N-methylation of nicotinamide, pyridines and other structural analogs, playing an important role in the biotransformation and detoxification of many xenobiotics. We analysed the enzyme expression in paired tumour (T) and non-tumour (NT) tissues obtained at surgery by RT-PCR, Real-Time PCR, western blot and immunohistochemical analyses. Compared with normal mucosa, OSCC exhibited significantly increased expression of NNMT in 11 of 22 (50 %) examined patients. Interestingly, NNMT was upregulated in most of the favourable OSCCs (N 0). Both, pT and pathological staging showed an inverse correlation with NNMT mRNA levels, and a significant negative association of the amount of NNMT expressed by tumour tissue compared to the adjacent normal mucosa was found with metastasis. We also evaluated the effect of shRNA-mediated inhibition of NNMT on the proliferative potential and apoptosis of oral cancer cell line PE/CA-PJ15. ShRNA vectors targeted against NNMT efficiently suppressed gene expression, showing inhibition rates around 70 %, observed at both the mRNA and protein levels. The shRNA-mediated gene silencing of NNMT resulted in a significant rise in apoptosis rate.

Preliminary studies on salivary NNMT by western blot showed strong immunoreactive bands in samples of OSCC patients and negative or weakly positive bands in normal saliva samples.

The present data support the hypothesis that NNMT plays a role in tumour expansion and represents a highly promising marker for early detection of oral cancer.

214

**IDENTIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI SOMATICHE DI K-RAS NEL CARCINOMA DEL COLON MEDIANTE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE/IBRIDAZIONE INVERSA**

R. De Miglio<sup>1</sup>, A. Mura<sup>2</sup>, M. Uras<sup>2</sup>, M. Contini<sup>2</sup>, P. Cossu Rocca<sup>2</sup>, S. Mulas<sup>2</sup>, S. Ena<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, G. Massarelli<sup>2</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari

<sup>2</sup>Istituto di Anatomia Patologica, Università di Sassari

Il Carcinoma Colo-Rettale (CRC) è considerato una delle principali emergenze sanitarie al mondo, ponendosi al terzo posto tra i tumori più comuni in termini di incidenza ed al secondo per mortalità. Trials clinici hanno dimostrato l'efficacia del trattamento con anticorpi monoclonali contro il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) nei pazienti con CRC metastatico. Analisi retrospettive hanno successivamente evidenziato che i pazienti con mutazioni del K-RAS nel codone 12 e 13 non beneficiano di questa terapia. Scopo del nostro studio è la valutazione dello stato mutazionale di K-RAS su campioni neoplastici fissati in formalina ed inclusi in paraffina mediante un saggio commerciale basato su tecniche di amplificazione/ibridazione inversa, e validato attraverso il sequenziamento genico diretto. Sono stati studiati 34 casi di CRC in stadio avanzato (T4, M0; T3, M1) mediante dissezione manuale del tessuto neoplastico per garantire la presenza di almeno il 70% di cellule tumorali, al fine di evitare falsi negativi. Dopo la l'amplificazione mediante PCR dei codoni 12 e 13, si è proceduto alla ibridazione inversa dei prodotti di PCR marcati con biotina con le sonde oligonucleotidiche adese su striscia; la rivelazione degli alleli mutati e della banda di controllo della PCR è stata evidenziata attraverso reazione enzimatica-colorimetrica. Le analisi hanno evidenziato la presenza di specifiche mutazioni a carico dell'esone 2 (codone 12-13) in 22 casi su 34 analizzati con il kit commerciale. Tali risultati sono stati confermati dal sequenziamento genico diretto. I risultati ottenuti hanno mostrato una comparabile sensibilità del kit di amplificazione/ibridazione inversa rispetto al sequenziamento diretto. Seppure la tecnica del sequenziamento appaia più vantaggiosa in termini economici, tale metodica necessita di apparecchiature e competenze non sempre di facile disponibilità. I vantaggi del kit commerciale consistono in una più semplice esecuzione ed applicabilità anche in laboratori privi di specifiche e costose apparecchiature. L'esecuzione di queste metodologie costituisce un'ulteriore campo di applicazione della biologia molecolare, in particolare nella definizione di indicatori molecolari di risposta al trattamento.

215

**ALTERAZIONI DI PARAMETRI BIOCHIMICI IN DIVERSE DISCIPLINE SPORTIVE**

G. Trinchese<sup>1</sup>, F. Spampanato<sup>1</sup>, G. Lo Scalzo<sup>1</sup>, A. Avella<sup>1</sup>, A. Auriemma<sup>1</sup>, A. D'Alessio<sup>1</sup>, L. Giordano<sup>1</sup>, S. Sorrentino<sup>1</sup>, L. Spinelli<sup>1</sup>, S. Fedele<sup>1</sup>, P. Ambrosio<sup>1</sup>, L.A. Napolitano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Lab. di Patologia Clinica ASL NA 3/Sud, Ospedale S.Maria della Pietà, Nola

Introduzione. Lo studio dei comportamenti di vari indici ematologici e biochimici può essere utile al fine di evidenziare eventuali condizioni patologiche o parafisiologiche che potrebbero arrecare danno all'atleta.

Materiale e Metodi. Abbiamo analizzato la concentrazione sierica di mioglobina, CK-MB, troponina T, pro-BNP in 12 giocatori di palla a volo, con età media di 28 anni, prima, subito dopo e 24 ore dalla fine della gara ed in un atleta iscritto alla mezza maratona "Mare e Monti" di Sorrento 2009. I sieri degli atleti sono stati analizzati su sistema "Modular Analytics E170" della ROCHE e il sangue con K3EDTA sul sistema Coulter LH750.

Risultati. I prelievi effettuati dopo la gara non presentano modifiche per troponina e pro-BNP; sono risultati alterati, nei singoli atleti, ma in modo più marcato nel maratoneta, sia la mioglobina che il CK-MB; i risultati dei prelievi fatti 24 ore dalla fine della gara rientrano nel range di normalità. Eritrociti, emoglobina, ematocrito e piastrine non hanno evidenziato modifiche significative. I leucociti sono risultati discretamente aumentati.

Discussione. I dati biochimici di atleti che praticano sport agonistici diversi, quali il pallavolista ed il fondista, hanno evidenziato un aumento della CK-MB e della mioglobina in tutti gli atleti valutati subito dopo la gara. Tale aumento può essere ascritto ad una rhabdmiolisi scheletrica da intenso esercizio fisico. Abbiamo rilevato, inoltre, una alterazione del conteggio

leucocitario: la frazione "neutrofila" si è mostrata nettamente aumentata in tutti gli atleti, solo nel runner si è evidenziata il contemporaneo e netto aumento anche della frazione "basofila". La maggiore intensità agonistica potrebbe influire su questo dato comunque da riconfermare.

**Bibliografia**

Laslett L, Eisenbud E, Lind R. Evidence of myocardial injury during prolonged strenuous exercise *Am J Cardiol* 1996;78:488-490.

216

**RECOVERY FROM THE ULTRAENDURANCE RACE MAGRAID 2009: MUSCLE AND CARDIAC DAMAGE BIOMARKERS**

S. Cauci<sup>1</sup>, G. Stel<sup>3</sup>, L. Debellis<sup>2</sup>, S. Lazzer<sup>2</sup>, D. Salvadeo<sup>2</sup>, G. Antonutto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina, Scienze Motorie, Udine, Italy; Gruppo SIBIOC Medicina di Laboratorio dello Sport

<sup>2</sup>Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina, Scienze Motorie, Udine, Italy

<sup>3</sup>Dip. Patologia e Medicina Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina, Udine, Italy

The purpose of this study was to examine circulating biomarkers of skeletal muscle and cardiac tissue damage to gain insight into the recovery process from a 3 days long ultraendurance race, MAGRAID June 19-21, "Magredi del Cellina-Meduna", Pordenone, Italy, 2009. Twelve athletes gave consent to participate in the investigation, of these 10 performed the entire race, and 2 others did the first day run but did not perform the second and third day runs. Each participant had blood samples obtained at the same time of the day 1-2 hours before the first day run (Friday, June 19; T1), less than 1 hour after the end of the entire race (Sunday, June 21; T2), and then 96-120 hours after the race (Thursday/Friday, June 25/26; T3). Complete hemogram data were obtained. Additionally, blood samples were analyzed for concentrations of total creatine kinase (CK), the isoenzyme CK-MBm, lactate dehydrogenase (LDH), myoglobin, cardiac troponin I (cTnI), and C-reactive protein (hsCRP). The MAGRAID runners showed significantly ( $p < 0.05$ ) increased concentrations of CK (T2 > T1 and T3), CK-MBm (T2 > T1 and T3), myoglobin (T2 > T1 and T3), and LDH (T2 > T1 and T3). Very few changes were observed in cTnI, indicating absence of cardiac tissue damage. Notably, the MAGRAID 2009 winner had the lowest myoglobin value at the end of the race, i. e. on T2. In conclusion, these data indicate that participation in the ultraendurance MAGRAID race results in some degree of tissue damage but with minimal, if any, cardiac tissue damage. A transient inflammatory response occurs, with complete recovery in 4-5 days post-race. As previously noted in the literature, some type of "adaptation" to the shortly repeated endurance performance may have occurred with regard to tissue damage responses.

217

### PLATELET ACTIVATION AND BUBBLE FORMATION ARE REDUCED FROM HYPERBARIC OXYGENATION (PRE-TREATMENT)

F. Savini<sup>1</sup>, A. Pennelli<sup>1</sup>, G. Nubile<sup>2</sup>, C. Di Ilio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. "G. D'Annunzio", Chieti

<sup>2</sup>Osp. "G. Bernabeo", Ortona

Bubble formation and platelet activation are major factors contributing to decompression sickness. We hypothesized that pretreatment with hyperbaric oxygen immediately before a dive may reduce bubble formation and platelet activation in humans. Five healthy volunteer subjects (1 female and 4 males; age, 33.6±2.9 years; height, 170±3 cm; weight, 71±8 kg, body mass index, 24.5±22.0 kg/m<sup>2</sup>) participated in this study with a 4-day protocol. On day 1, a multiplace hyperbaric chamber was used to compress all subjects with air to 4 atmosphere absolute (ATA) for 25 minutes; they were then decompressed to surface pressure at a rate of 10 m/min. Once surface pressure was reached, they were monitored with precordial ultrasonic Doppler at 20 min, 50 min and 80 min. Venous blood samples were obtained immediately before and after pressure exposure. On day 2, all subjects were compressed at 1.6 ATA for 45 min with 100% oxygen; they were then decompressed to surface pressure at a rate of 10 m/min. As soon as they reached surface pressure, they were immediately exposed to the same compression-decompression protocol as day 1; blood samples were taken after the second pressure exposure. Platelet activation was examined before and after exposure. On days 3 and 4, we inverted the protocol to minimize the influence of the first immersion on bubble formation. In comparison to the standard compression protocol, compression after hyperbaric oxygenation led to significantly reduced bubble numbers and platelet activation (11.4%±0.7% vs. 5.4%±0.5%, p<0.05). This study shows that hyperbaric oxygenation pretreatment significantly reduces decompression-induced bubble formation and platelet activation. Hyperbaric oxygenation pretreatment may reduce the risk of decompression sickness in at-risk activities.

**Key words** Bubbles • Platelet activation • Hyperbaric oxygenation • Doppler • Diving • Decompression

#### References

1. Spencer MP, Campbell SD (1968) Development of bubbles in venous and arterial blood during hyperbaric decompression. *Bull Mason Clinic* 22:26-32
2. Bosco G, Yang ZJ, Savini F et al (2001) Environmental stress on diving-induced platelet activation. *Undersea Hyperb Med* 28:207-211

218

### HOMOCYSTEINE LEVELS IN FEMALE ATHLETES

S. Cauci<sup>1</sup>, M. Di Santolo<sup>2</sup>, G. Stel<sup>3</sup>, D. Calucci<sup>2</sup>, G. Banfi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina, Udine, Italy; Gruppo SIBioC Medicina di Laboratorio dello Sport

<sup>2</sup>Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina, Udine, Italy

<sup>3</sup>Dip. Patologia e Medicina Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina, Udine, Italy

<sup>4</sup>IRCCS Ospedale Ortopedico Galeazzi e Facoltà di Medicina, Milano, Italy; Gruppo SIBioC Medicina di Laboratorio dello Sport

**Purpose.** In general, there is limited attention to the health status of non-professional female athletes. Recreational athletes are not invited to check and take care of their health status like elite athletes, despite non-elite athletes account for a much larger proportion of the female population than elite athletes. To the best of our knowledge, our study is the largest one to assess the prevalence of elevated levels of HCY [at risk for several adverse outcomes, especially cardiovascular disease (CVD)], in non-professional young adult Italian female athletes with respect to matched sedentary women.

**Methods.** We examined 124 were recreational athletes performing 8.7 ± 2.46 h/week exercise and 116 were sedentary controls. Blood homocysteine, folate, and lipid markers – triglycerides, total cholesterol, low-density (LDL) and high-density (HDL) lipoprotein cholesterol – were evaluated.

**Results.** Cross-sectional analyses revealed no significant differences in median homocysteine, folate, and lipid markers between recreational athletes and sedentary women.

Frequency of elevated homocysteine levels ≥ 12.0 μmol/l (22.6% v 22.4%) and ≥15.0 μmol/l (8.9% v 6.0%) were not different between athletes and controls. Continuous homocysteine was inversely related to folate (P < 0.001), and positively associated with age (P = 0.009). However, homocysteine was not associated with hours of exercise, BMI, and lipid markers. Interestingly, study women with serum folate depletion (< 3.0 μg/l) were 2.5-fold and 4.5-fold more likely to have homocysteine ≥ 12.0 and ≥ 15.0 μmol/l, respectively. Also, folate levels < 5.0 μg/l were associated with 2.5-fold higher frequency of homocysteine ≥ 12.0 μmol/l.

**Conclusion.** Recreational physical exercise does not impact homocysteine levels among young non-obese women. However, low folate increases the risk for elevated homocysteine among normal-weight pre-menopausal women. Consequently, increased folate intake more than recreational physical activity should be recommended to young women with elevated homocysteine.

#### Reference

1. Di Santolo M, Banfi G, Stel G, et al. Association of recreational physical activity with homocysteine, folate and lipid markers in young women. *Eur J Appl Physiol* 2009;105:111-8.

219

**ANDROGEN RECEPTOR SIGNALING INDUCED BY SUPRAPHYSIOLOGICAL DOSES OF DIHYDROTESTOSTERONE IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES**

E. Imperlini<sup>1</sup>, S. Spaziani<sup>3</sup>, A. Mancini<sup>2</sup>, D. Martone<sup>3</sup>, A. Alfieri<sup>3</sup>, P. Buono<sup>3</sup>, S. Orrù<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate scrl, Napoli, Italy

<sup>2</sup>Fondazione SDN-IRCCS, Napoli, Italy

<sup>3</sup>Facoltà di Scienze Motorie, Università di Napoli "Parthenope", Napoli, Italy

Anabolic androgenic steroids (AASs) a class of steroid hormones related to testosterone (T) are natural ligands of androgen receptor (AR), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. AR binds specific DNA elements, known as androgen response elements (AREs). T, the main male sexual hormone, binds AR both directly and indirectly, through conversion into dihydrotestosterone (DHT), its more active metabolite (1). AASs are frequently detected in the urine of doped athletes; surprisingly, their consumption is growing also among sport amateurs and adolescents (2). AASs effects can be very divergent depending on the target cells and/or tissues. In the attempt to predict and prevent adverse effects due their abuse, we studied AR protein signaling in human peripheral blood lymphocytes treated with supraphysiological amount of DHT, reproducing doses and mode of administration of AASs consumers.

We applied the 2D DIGE technology coupled to Mass Spectrometry analysis and identified about thirty differentially expressed proteins. These proteins were then investigated by means of bioinformatic tools, in order to look for AR-regulated species and highlight cellular processes affected by the DHT treatment.

In particular, we found that five species were characterized by a consensus ARE sequence in the promoter region of related coding genes: they were over-expressed *Akr1a1*, *Gstp1*, *Stat5a*, and *Gsn*, and under-expressed *Xrcc5*. Our proteomic approach revealed also that high excess of DHT activates the drug detoxification process, stimulates cell motility and promotes survival rather than apoptosis. As for cell motility and apoptosis, the ability to invade tissue and escape programmed cell death is critical in carcinogenesis. These cellular processes may play a key role in explaining at molecular level the health risks associated with DHT abuse.

References

1. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev* 2005;105:3352-70.
2. Sato SM, Schulz KM, Sisk CL, Wood RI. Adolescent and androgens, receptors and reward. *Horm and Behav* 2008;53:647-58.

220

**DETERMINAZIONE DELLA CISTATINA C NEL LIQUIDO CEREBROSPINALE**

G. Previtali<sup>1</sup>, L. Marziani<sup>2</sup>, M. Amadei<sup>1</sup>, M. Donati<sup>1</sup>, M. Frasanni<sup>1</sup>, A.L. Zecca<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, P.O. Fidenza (PR)

<sup>2</sup>U.O. di Anestesia Rianimazione, P.O. Fidenza (PR)

<sup>3</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, P.O. Borgotaro (PR)

La cistatina C (Cys C) è un inibitore delle cisteina proteasi ed ha la proprietà biologica di legarsi alle catepsine B e H (1) che possiedono una cisteina nel sito attivo. La Cys C è prodotta da tutte le cellule nucleate dell'organismo risultando a concentrazioni particolarmente elevate nel liquido seminale, nel liquido cerebrospinale (CSF) e nel latte materno. Nel sistema nervoso centrale (SNC) la Cys C è prodotta attivamente nei plessi coroidei dove è stata rilevata con metodi immunocitochimici. Nel SNC la molecola è stata altresì evidenziata nelle cellule della microglia, negli astrociti ed in diversi neuroni. I valori di Cys C nel CSF sono stati determinati con metodo nefelometrico utilizzando il kit diagnostico Cystatin C PET (Particle-Enhanced-Turbidimetric) della ditta Dako su strumento Immage 800 Immunochemistry System della ditta Beckman Coulter. Sono stati analizzati campioni di CSF di 39 pazienti ortopedici volontari, 22 maschi e 17 femmine età media 49 anni (19-91), senza apparenti disordini neurologici e sottoposti ad anestesia subaracnoidea. Considerando l'intervallo compreso fra il 2.5 e 97.5 percentile i valori di Cys C variano da 0.96 a 5.0 mg/L con una media di 2.6 mg/L. Il coefficiente di variazione fra gli individui è del 38%. Pazienti con idrocefalo ostruttivo registrano valori molto elevati di Cys C suggerendo l'importanza del flusso liquorale nel determinare la concentrazione della molecola nel CSF e rendendo conto della notevole variabilità biologica fra gli individui.

Bibliografia

1. Atsushi Nagai et al. Shimane Medical University Izumo (Neurology 2000)

221

**VALORI DI GAMMA-GLUTAMMILTRANSFERASI NEL DIABETE MELLITO GESTAZIONALE**G. Cattozzo<sup>1</sup>, C. Albeni<sup>1</sup>, A. Calonaci<sup>1</sup>, G. Carluccio<sup>1</sup>, I. Franzetti<sup>2</sup><sup>1</sup>Lab. di Analisi Chimico-Cliniche, A. O. U. Osp. di Circolo e Fondazione Macchi, Varese<sup>2</sup>Diabetologia e Malattie metaboliche, A. O. U. Osp. di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

Valori di  $\gamma$ -glutammitransferasi (GGT) del siero prossimi al valore superiore di riferimento o poco più alti sono associati ad aumentato rischio di diabete mellito di tipo 2, indipendentemente dal consumo di alcool e dal BMI. Scopo di questo lavoro è verificare l'associazione dei valori di GGT del siero al rischio di diabete mellito gestazionale (GDM), caratterizzato da resistenza all'azione dell'insulina, analogamente al diabete mellito di tipo 2. Venivano coinvolte nello studio 344 gestanti al secondo trimestre di gravidanza, di età compresa tra 16 e 43 anni (mediana e media 30; deviazione standard 6); la presenza di insufficienza renale e malattie epatiche o pancreatiche era esclusa sulla base dei risultati di un pannello standard di esami ematochimici. La diagnosi di GDM era posta sulla base del risultato della curva da carico orale con 100 g di glucosio (OGTT), applicando i criteri ADA, oppure in presenza di un valore di concentrazione del glucosio nel siero superiore a 200 mg/dL in seguito a somministrazione di un carico orale di 50 g. La concentrazione di attività catalitica della GGT del siero veniva misurata con il sistema analitico Olympus AU680, che utilizza un metodo basato sulla standardizzazione IFCC. Nelle gestanti affette da GDM (n = 21) la GGT era compresa tra 7 e 42 U/L (mediana 11,0, primo quartile 9,3 e terzo quartile 16,8 U/L), mentre nelle gestanti esenti da GDM (n = 323) la GGT risultava compresa tra 4 e 39 U/L (mediana, primo e terzo quartile pari a 8,6, 6,7 e 11,7 U/L, rispettivamente). Il confronto tra mediane evidenziava una differenza significativa (test di Wilcoxon;  $p < 0,001$ ). Tra le gestanti con concentrazioni di GGT inferiori al primo quintile della distribuzione di riferimento (GGT  $\leq 6$  U/L) non si osservava nessun caso di GDM, mentre per concentrazioni di GGT superiori si riscontrava aumento della prevalenza di GDM; questa risultava più elevata (17 %) per concentrazioni superiori allo specifico intervallo di riferimento (GGT  $> 25$  U/L). In conclusione, valori di GGT elevati, sebbene compresi nell'intervallo di riferimento, sono associati a più elevato rischio di GDM; tuttavia l'impiego della GGT a scopo diagnostico è inficiato dalla sovrapposizione di valori osservabile in gestanti con GDM e con OGTT normale.

222

**ANTIOXIDANT DEFENCE MECHANISMS IN BLOOD FROM AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTS: OVERTIME ASSESSMENT**M.R. Metelli<sup>1</sup>, P. Bongioanni<sup>2</sup>, C. Domenichini<sup>1</sup>, F. Manzone<sup>1</sup>, F. Fulceri<sup>1</sup>, E. Giro<sup>2</sup>, B. Rossi<sup>2</sup>, P. Pietrini<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. of Clinical Biochemistry, Dept. of Experimental Pathology, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, University of Pisa, Italy<sup>2</sup>Neurorehabilitation Unit, Dept. of Neuroscience, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, University of Pisa, Italy

**Objectives.** Oxidative stress markers have been found in nervous and peripheral tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Antioxidant defence mechanisms counteract the effects of reactive oxygen species endogenously or exogenously produced. In the present study, we assayed overtime in ALS patients erythrocyte glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD)-1 activities, together with total antioxidant status (TAOS) levels, to evaluate the involvement of oxidative stress during disease progression.

**Subjects and Methods.** Forty-nine (19 women and 30 men) ALS patients were studied. Disease severity was scored by means of the ALS Functional Rating Scale, and patients subgrouped accordingly into 3 classes: I (scores between 40 and 31); II (scores from 30 to 11); III (between 10 and 0). During a two-year period, every two months, after having drawn blood samples in the morning, erythrocyte GP, GR and SOD-1 activities and TAOS plasma levels were assayed by means of RANDOX kits. Data refer to assays at time of the first visit ( $T_0$ ) and those at time of the most recent clinical examination ( $T_n$ ).

**Results.** In class II patients mean GR activity and TAOS levels were found significantly ( $p < 0.001$ ) higher at  $T_n$  vs  $T_0$  ( $7.1 \pm 2.1$  vs  $5.1 \pm 2.5$  U/g Hb, and  $0.9 \pm 0.3$  vs  $0.7 \pm 0.2$  mM, respectively). In both class I and class II patients SOD-1 activities were significantly lower at  $T_n$  vs  $T_0$  ( $577.2 \pm 127.2$  vs  $1326.7 \pm 219.4$  U/g Hb ( $p = 0.005$ ) and  $846.3 \pm 327.8$  vs  $1144.1 \pm 287.4$  U/g Hb ( $p = 0.003$ ), respectively). No significant differences in mean GP activity levels were observed among ALS patients' classes.

**Discussion.** Our findings of higher mean GR activity values and TAOS levels after a 2-year follow-up of relatively stable patients, namely those not progressing from class II to class III within the study period, clearly support the protective role of such antioxidant defence mechanisms. On the other hand, low mean SOD-1 activity values stand for a negative effect of high SOD-1 activity on disease progression, probably due to a toxic gain of function, so that a lower enzyme activity is preferable to a higher one.

223

**O- $\beta$ -N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDASE IN ERYTHROCYTES OF ITALIAN AIR FORCE ACROBATIC PILOTS**M.M. Corsi<sup>1</sup>, L. Massaccesi<sup>2</sup>, G. Dogliotti<sup>3</sup>, E. Vianello<sup>3</sup>, M. Agrifoglio<sup>4</sup>, F. Palumbo<sup>5</sup>, G. Goi<sup>2</sup><sup>1</sup>Dept. of Human Morphology and Biomedical Sciences "Città Studi", Laboratory of Clinical Pathology, University of Milan, Italy Laboratory of Biotechnological Applications, IRCCS Hospital Galeazzi, Milan, Italy<sup>2</sup>Dept. of Medical Chemistry, Biochemistry and Biotechnology, University of Milan<sup>3</sup>Dept. of Human Morphology and Biomedical Sciences "Città Studi", Laboratory of Clinical Pathology, University of Milan, Italy<sup>4</sup>Dept. of Cardiovascular Sciences, University of Milan, Italy<sup>5</sup>Legal Medicine Institute "A. Mosso", Italian Air Force, Milan, Italy

**Objectives.** Italian Air Force acrobatic pilots are occupationally susceptible to oxidative stress damage that can lead to overt signs and symptoms of hypoxia (1). Glycohydrolases are found on the plasma membrane and in the cytosol of human erythrocytes (2). Membrane and/or cytosol enzymes are involved in cellular aging, in signaling early membrane alterations (3) and in pathologies involving strong oxidative stress and physico-chemical alterations of the erythrocyte plasma membrane, such as Down's syndrome (4). We propose erythrocyte glycohydrolases as new, sensitive markers to assess oxidative stress. We undertaken a study to compare Italian Air Force Acrobatic pilots and healthy subjects, closely controlled as regards their nutritional condition, for oxidative stress and the levels of these glycohydrolases as markers of cellular alteration. Erythrocytes, with their 120-day life-span, offer a useful model for investigations during the pilot's three-month intensive training period. **Methods.** We measured erythrocyte levels of  $\beta$ -D-glucuronidase, hexosaminidase, O- $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase, plasma membrane fluidity and plasma hydroperoxides from 19 pilots in comparison with 40 matched healthy subjects.

**Results.** Plasma hydroperoxide levels and the erythrocyte ghosts's fluorescence anisotropy were significantly lower in the pilots. Levels of  $\beta$ -D-glucuronidase, O- $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase and hexosaminidase in pilots were significantly different from controls, respectively lower, higher and higher.

**Conclusions.** Pilots, in spite of their oxidative stress, are better protected than controls, probably as a result of their physical training and proper diet. Our results confirm that erythrocytes, with their 120-day span-life, are a useful model for investigating physiopathological conditions and that glycohydrolases are good markers for monitoring oxidative stress even in healthy people.

**References**

1. Nicholson PJ. *Postgrad Med J* 1995; 71:649-652.
2. Massaccesi L, et al. *Clin Biochem* 2007; 40:467-477.
3. Goi G, et al. *Exp Gerontol* 2005; 40:219-225.
4. Massaccesi L, et al. *Mech Ageing Dev* 2006; 127:324-331.

224

**ASSAY OF MONOCLONAL FREE LIGHT CHAINS OF IMMUNOGLOBULIN IN URINE BY AN IMMUNOTURBIDIMETRIC METHOD**M.C. Bonini<sup>1</sup>, M. Ranzani<sup>1</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, M.R. Cattaneo<sup>1</sup>, A. Mastroianni<sup>1</sup>, D. Morelli<sup>1</sup><sup>1</sup>Medicina di Laboratorio 1, Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano

We studied the diagnostic performance of an immunoturbidimetric method (IMT) using a polyclonal anti sera who reacts against free light chains (CLL)  $\kappa$  and  $\lambda$  in urine compared the results with immunofixation (IF). Utilizing the cut off reported into the kit, sensitivity and specificity were 74.5 and 77 % respectively. In 7 samples we measured levels of both light chains above the cut off despite negative IF; to explain this reaction of the antisera we performed out IF on urine sample after their concentration. Immunoprecipitation pattern evidenced that in 2 out of 7 samples anti sera reacted to both light chains type while 5 against to an undetermined antigen. To improve data interpretation we lowering the cut off of negativity (< 5 mg /L for  $\kappa$  and  $\lambda$ ), raising the one of positiveness (> 25 and 50 respectively for  $\kappa$  and  $\lambda$ ) and the data has been examined by an algorithm. The number of false positives decrease from 23 to 3 for both light chains and high cut off varied for the two light chains allows a reduction of false negatives from 14 to 3. The decision-making algorithm showed that 65 samples out of 150 fall into a "gray zone" (43.3%) which is necessary to test by IF. After this analysis the sensitivity and specificity of results outside the gray zone were 91 and 94% respectively. On the basis of these results we concluded which the best application of this method is monitoring BJP of myeloma patients in follow-up (1), but can not be ruled out one possible use for screening BJP even if further studies are needed.

**Reference**

1. Graziani MS, Merlini G, et al. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(3):338-46.

225

**DETERMINAZIONE NEL PLASMA DI  
DIMETILARGININA ASIMMETRICA (ADMA) E  
DI DIMETILARGININA SIMMETRICA (SDMA):  
VALIDAZIONE ANALITICA E CLINICA**

C. Artusi<sup>1</sup>, M. Ivanova<sup>1</sup>, G.M. Boffa<sup>2</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

<sup>2</sup>Dip. di Cardiologia, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

**Introduzione.** Le numerose recenti evidenze scientifiche che dimostrano come ADMA rappresenti un utile marcatore biochimico di disfunzione endoteliale, hanno favorito la sua introduzione nella pratica clinica, mentre pochi studi hanno finora valutato il possibile ruolo di SDMA come marcatore endogeno di funzionalità renale.

**Obiettivi.** 1) Validazione del metodo analitico in HPLC; 2) Determinazione dei valori di riferimento; 3) Valutazione della concentrazione plasmatica di ADMA in pazienti con patologie caratterizzate da disfunzione endoteliale; 4) Valutazione della relazione tra concentrazione plasmatica di SDMA e velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) oltre che con creatinina plasmatica in pazienti con insufficienza renale cronica.

**Materiali e Metodi.** I valori di riferimento sono stati calcolati su 140 donatori sani (107 maschi, 33 femmine, età 18-65 anni). Per la validazione clinica sono stati selezionati 4 gruppi di pazienti con elevato rischio di complicanze cardiovascolari: insufficienza cardiaca cronica, diabete di tipo II, insufficienza renale cronica (IRC), ipertensione arteriosa polmonare.

**Risultati.** Curva di calibrazione: lineare per tutto il range di concentrazioni selezionate (0.5-10.0µmol/L). Recupero assoluto e relativo: 96-106%; Precisione nella e tra le serie: CV<5%; Accuratezza -3,57/+6,00%, bias -0,03/+0,06µmol/L. I valori di riferimento ottenuti per p-ADMA e p-SDMA sono 0,34-0,63µmol/L e 0,26-0,57µmol/L rispettivamente. I livelli di p-ADMA aumentano in tutti i gruppi di pazienti rispetto al gruppo di controllo (p<0,0001). I livelli di p-SDMA sono significativamente elevati (p<0,0001) nei pazienti con IRC. È stata riscontrata un'elevata significatività della correlazione tra i livelli di p-SDMA ed eGFR (R=0,740) e con la creatinina plasmatica (R=0,700).

**Conclusioni.** I risultati ottenuti supportano l'utilità di p-ADMA nella valutazione biochimica della funzionalità endoteliale. I dati preliminari dello studio, suggeriscono peraltro che SDMA può essere utilizzato come un utile marcatore di funzionalità renale, specialmente nella popolazione pediatrica nella quale l'uso di eGFR non è raccomandato.

226

**DOPAMINE PEROXIDATION: A NOVEL STUDY  
FROM RAT BRAIN AREA**

A. De Iulii<sup>1</sup>, P. Cecchinato<sup>2</sup>, G. Arrigoni<sup>2</sup>, G. Mercanti<sup>3</sup>, P. Giusti<sup>3</sup>, F. Vianello<sup>2</sup>, P. Arslan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Università degli Studi di Padova

<sup>2</sup>Dip. di Chimica Biologica, Università degli Studi di Padova

<sup>3</sup>Dip. di Farmacologia e Anestesiologia, Università degli Studi di Padova

Oxidative metabolism of dopamine (DA) appears to be involved in several, intersecting pathways underlying Parkinson's disease (PD) pathogenesis (1). We have recently reported on in gel-detection of a dopamine (DA) peroxidizing activity from human midbrain tissue, by using DA and hydrogen peroxide as substrates (2). This enzymatic reaction, analysed by mass spectrometry, revealed the presence of proteins that may play a role in neurodegenerative disease, highlighting a possible functional link among DA redox cycle and protein.

Pursuing the aim to untangle this intricate pathway, we tested the staining procedure of DA peroxidizing activity in rat brain tissue homogenates, in order to make use of our method of investigation in PD animal models. Distinct rat brain areas were analysed: striatum, substantia nigra, brain stem, frontal lobe, cerebellum. A red-orange activity gel band, similarly to that previously developed from human midbrain tissue (2), appeared in all the rat brain regions selected. Reactivity of striatum and substantia nigra were expected, brain stem and frontal lobe showed sharp and faint colour reaction, respectively. Remarkable enzymatic activity was also developed from cerebellum. Mass spectrometry analysis of the specific activity bands is now in progress in order to identify the proteins responsible of the enzymatic reaction.

Present results appear to validate our procedure, providing a possible, additional and useful approach to the study of oxidative metabolism of DA.

**References**

1. Greenamyre JT & Hastings TG, Science 304:1120-1122, 2004.
2. De Iulii A, et al. Biochim Biophys Acta 1784:1687-1693, 2008.

227

**DOPAMINE PEROXIDATION: NEW EVIDENCES IN HUMAN CEREBELLUM**

A. De Iuliis<sup>1</sup>, P. Cecchinato<sup>2</sup>, G. Arrigoni<sup>2</sup>, P. Zambenedetti<sup>3</sup>, F. Vianello<sup>2</sup>, P. Arslan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Università degli Studi di Padova

<sup>2</sup>Dip. di Chimica Biologica, Università degli Studi di Padova

<sup>3</sup>Sevizio di Anatomia Patologica, Ospedale di Dolo, Venezia

The cerebellum is brain area not traditionally considered dopaminergic, but the presence of neuronal elements, indicative of dopaminergic neurotransmission, suggest that may contribute to the motor symptoms or dyskinesia seen in Parkinson's disease (1).

We have recently reported on in gel-detection of a dopamine (DA) peroxidizing activity from human midbrain tissue, by using DA and hydrogen peroxide as substrates (2). This enzymatic reaction, analysed by mass spectrometry, revealed the presence of proteins that may play a role in neurodegenerative disease, highlighting a possible functional link among DA redox cycle and protein metabolism.

In order to investigate on the functional release of DA occurring in cerebellum, we analysed this human brain region by using the in gel detection of DA peroxidizing activity, by us set out, combined with mass spectrometry analysis.

A strong red-orange activity band, similarly to that previously developed from human midbrain tissue (2), appeared in cerebellar total vermis, cortex and central white matter. Mass spectrometry analysis of the specific activity bands is now in progress in order to identify the proteins responsible of the enzymatic reaction. These results, validating our method of investigation, would allow us a better understanding of the dopaminergic system and the related oxidative metabolism of DA.

References

1. Hurley M J, et al. *Eur J Neurosci* 2008;18:2668-72.
2. De Iuliis A, et al. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:1687-93.

228

**EFFECTS OF GENISTEIN ON ANTIOXIDANT ENZYME SUPEROXIDE DISMUTASE IN COLON CANCER CELLS**

C. Clemente<sup>1</sup>, F. Russo<sup>1</sup>, A. Orlando<sup>1</sup>, B. D'Attoma<sup>1</sup>, C. Messa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Experimental Biochemistry, IRCCS "S. De Bellis", Castellana G, Bari

Genistein, the major isoflavone soybean, has shown to have protective effects against cancer. In vitro experiments have demonstrated that genistein influences proliferation and apoptosis in tumor cells and inhibits ornithine decarboxylase and polyamine synthesis (1). Genistein seems to exhibit antioxidant properties and determine a decreased oxidative damage in cells modulating antioxidant enzymes as manganese and copper/zinc superoxide dismutase (MnSOD, CuZnSOD). Various reports demonstrated that tumor cells have lower antioxidant enzyme activities than their normal cell counterparts and MnSOD is commonly decreased or deleted in cancer cells. The aim of the our study was to investigate the effects of different genistein concentrations (0.1, 10, 20, 30, and 100  $\mu$ M) on the activity of MnSOD and CuZnSOD in human DLD-1 colon cancer cells.

Methods. SOD activities were assayed by the xanthine/xanthine oxidase/nitrobluetetrazolium method. MnSOD activity was assayed in the presence of sodium cyanide, which inhibits Cu/ZnSOD activity. Results were analysed by one-way analysis of variance (Anova) and Tukey's multiple comparison test.

Results. Genistein at 100  $\mu$ M increased significantly MnSOD activity respect to control cells ( $0.67 \pm 0.08$  U/mg protein vs  $0.36 \pm 0.12$  U/mg protein,  $p < 0.05$ ) and respect to treated cells with lower concentrations of genistein (at 0.1  $\mu$ M  $0.27 \pm 0.09$  U/mg protein,  $p < 0.01$ ; at 10  $\mu$ M  $0.37 \pm 0.14$  U/mg protein,  $p < 0.05$ ; at 20  $\mu$ M  $0.28 \pm 0.13$  U/mg protein,  $p < 0.01$ ; at 30  $\mu$ M  $0.26 \pm 0.09$  U/mg protein,  $p < 0.01$ ). CuZnSOD activity was not significantly altered by genistein treatment. These results suggest that at 100  $\mu$ M genistein acts modulating the antioxidant enzyme MnSOD in human DLD-1 colon cancer cells.

Reference

1. Linsalata M et al. *Nutr Cancer* 2005;52(1):84-93.

229

### MONITORAGGIO DEL TRATTAMENTO DELL'EPATITE C CON IL DOSAGGIO DELLE CATENE LEGGERE LIBERE

P. Cipriani<sup>1</sup>, F. Leone<sup>2</sup>, G. Ferranti<sup>1</sup>, S. Battarelli<sup>2</sup>, A. Petrucca<sup>2</sup>, G. Salerno<sup>1</sup>, C. Ialongo<sup>1</sup>, M.T. Corsetti<sup>1</sup>, A. Pennica<sup>2</sup>, F. Capogreco<sup>1</sup>, G. La Verde<sup>2</sup>, P. Cardelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>II° Facoltà Medicina e Chirurgia Università Sapienza di Roma

<sup>2</sup>Az. Ospedaliera S'Andrea di Roma

Scopo del lavoro. Monitorare mediante il dosaggio delle catene leggere libere, la risposta al trattamento dell'epatite C in soggetti in terapia con Ribavirina (dose in funzione del peso corporeo) ed interferone (1.5ug/kg/settimana).

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati 6 soggetti (3 maschi e 3 femmine) con crioglobulinemia di tipo II e III in terapia combinata con interferone e ribavirina. I pazienti sono stati monitorati prima dell'inizio della terapia (T0) e dopo 4 settimane di trattamento (T1) eseguendo su campioni di sangue periferico i dosaggi di: catene leggere libere Kappa e lambda (FLC  $\kappa$  e  $\lambda$  kit: The Binding Site/Radim); valutazione quantitativa del numero di copie virali del virus HCV (Cobas Amplicor HCV); determinazione della Proteina C reattiva ultrasensibile hs-PCR (Vitros-Fusion 5.1, Ortho Clinica-Diagnostics). I dati sono stati analizzati con test non parametrici per la mediana (Mann-Whitney) e correlazione di Person mediante SPSS v.17, significatività  $p < 0,05$ .

Risultati. Le medie delle FLC  $\kappa$  sono risultate più alte al tempo T0 ( $24,3 \pm 11,3$  mg/L vs  $10,9 \pm 5,4$  mg/L;  $p=0,02$ ;  $r=0,95$ ); le medie delle FLC  $\lambda$  sono state superiori al tempo T1 ( $18 \pm 3,4$  mg/L vs  $14,1 \pm 3,13$  mg/L;  $p=0,05$ ;  $r=0,93$ ); il rapporto  $\kappa/\lambda$  si è normalizzato al tempo T1 ( $0,57 \pm 0,22$  vs  $1,7 \pm 0,62$ ;  $p=0,004$ ;  $r=0,8$ ); la viremia è risultata inferiore al tempo T1 ( $p=0,02$ ) e la hs-PCR è stata più bassa al tempo T1 ( $0,45 \pm 0,27$  mg/L vs  $25,3 \pm 9,9$  mg/L;  $p=0,004$ ;  $r=0,96$ ). Inoltre una buona correlazione si ottiene tra i valori delle viremie ai tempi T0-T1 e quelli del rapporto  $\kappa/\lambda$  ( $r=0,94$ ;  $r=0,71$ ).

Discussione e Conclusioni. Dai dati ottenuti, si evince l'importanza del monitoraggio attraverso l'ausilio delle FLC come marker per valutare la risposta immunitaria all'azione farmacologica combinata. Il dosaggio delle FLC ed in particolare il rapporto  $\kappa/\lambda$  utilizzati in associazione con la viremia ed la hs-PCR, sembrano essere di particolare interesse nel monitoraggio sia terapeutico che metabolico (attivazione delle plasmacellule, soppressione virale) nel trattamento dell'epatite C.

#### Bibliografia

Clinical and epidemiological research: Serum-free light chain assessment in hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders; *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009;68:89-93.

230

### MONOCLONAL KAPPA COMPONENTS INVISIBLE AT IMMUNOFIXATION IN LIGHT CHAIN AMYLOIDOSIS (AL) AND LIGHT CHAIN DEPOSITION DISEASE (LCDD)

V. Valentini<sup>1</sup>, F. Lavatelli<sup>1</sup>, G. Palladini<sup>1</sup>, G. Sarais<sup>1</sup>, T. Bosoni<sup>2</sup>, P. Russo<sup>1</sup>, A. Foli<sup>1</sup>, L. Zenone Bragotti<sup>1</sup>, B. Amoroso<sup>3</sup>, R. Albertini<sup>2</sup>, R. Moratti<sup>2</sup>, G. Merlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Amyloid Research and Treatment Center, Biotech.

<sup>2</sup>Research Laboratory, Dept. of Biochemistry, Fondazione IRCCS San Matteo, Univ. of Pavia

<sup>3</sup>Clinical Chemistry Laboratory, "Fondazione IRCCS San Matteo", Univ. of Pavia

<sup>3</sup>The Binding Site

In AL amyloidosis and LCDD, monoclonal free light chains (mFLC) misfold and aggregate in tissues. We showed, on 115 AL patients, that  $\kappa/\lambda$  ratio of serum FLC had higher diagnostic sensitivity than serum immunofixation (sIFE) for  $\kappa$  clones, though urine IFE (uIFE) detected all  $\kappa$  mFLC missed by sIFE (1). This may be due to low-concentration polydisperse aggregates or to features impairing FLC recognition in sIFE. We investigated the prevalence of sIFE-invisible  $\kappa$  mFLC in the global population of AL and LCDD patients evaluated between 2004 and 2008 and tested the feasibility of characterizing sequence and biochemical properties of mFLC by immunoprecipitation from serum. uIFE and sIFE were performed with polyclonal anti  $\kappa$  (Dako, Glostrup, Denmark) and anti-free  $\kappa$  (The Binding Site, Birmingham, UK) antibodies (Ab) on in-house agarose gels. Serum FLCs were quantified by latex enhanced immunoassay (Freelite assay<sup>TM</sup>, The Binding Site) on a Behring BN II (Dade Behring, IL, USA) nephelometer. Tissue deposits were typed as  $\kappa$  by immunoelectron microscopy. For immunoprecipitation, the anti- $\kappa$  FLC Ab were linked to agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA) and incubated with 200  $\mu$ L of serum. Eluted FLC were analyzed by 2D-PAGE and MALDI-TOF MS on a Micromass MicroMX instrument, followed by protein recognition by database search. 9 (4%) of the 482 AL and 4 (44%) of the 9 LCDD patients evaluated between Jan 2004 and Dec 2008 had high serum  $\kappa$  FLC (median 135 mg/L, range 36.7-2710 mg/L) and  $\kappa/\lambda$  ratio (median 8, range 2.29-196.3), with negative sIFE. In 8 of the AL cases, uIFE was also negative. When tested, the use of anti-free  $\kappa$  Ab did not improve IFE sensitivity. Serum mFLC were isolated from 2 LCDD patients. In both, only discrete 25 kDa spots with neutral pI were visible at 2D-PAGE, with low polyclonal background; both FLC were assigned to  $\kappa 1$  subtype by MS sequencing and data base search, thus confirming clonality. The failure of IFE in detecting some  $\kappa$  mFLC does not seem related to the Ab used and has a high prevalence in LCDD. A few AL  $\kappa$  patients are missed by both sIFE and uIFE. Ongoing in-depth investigation of biochemical and biophysical properties of these circulating FLC may reveal distinctive features.

231

**PROGETTO PILOTA PER L'IMPLEMENTAZIONE DI UN METODO PER LA STANDARDIZZAZIONE DEL DOSAGGIO DELLA CREATININA SIERICA IN LABORATORI DI PUGLIA E BASILICATA**

V. Brescia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Patologia Clinica 1, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico, Bari

Il National Kidney Disease Education Program (NKDEP) raccomanda di calcolare e refertare la velocità di filtrazione glomerulare (GFR), quale indicatore di funzionalità renale. Unanime è il consenso circa la necessità di standardizzare la misura della creatinina prima dell'utilizzo nel calcolo della eGFR.

Scopo del progetto pilota. Sviluppare ed implementare un metodo per la standardizzazione della misura della creatinina in alcuni laboratori di Puglia e Basilicata al fine di fornire una stima della eGFR idonea per il suo utilizzo clinico. Materiali e Metodi. Il progetto è stato ideato nel dicembre del 2008. Ha previsto la figura di un responsabile scientifico del progetto, presso la Patologia Clinica del Policlinico di Bari, e la partnership del Gruppo VEQ S.Orsola-Malpighi di Bologna che ha fornito materiali (campioni) e metodologie di elaborazione dei dati (software). Il materiale utilizzato è costituito da un set di campioni di siero umano con valori di creatininemia assegnati con metodo di riferimento (spettrometria di massa a diluizione isotopica IDMS).

Risultati attesi. Al progetto hanno aderito n 21 Responsabili di laboratorio delle regioni di Puglia e Basilicata. La determinazione della creatinina è stata eseguita nei diversi laboratori con le strumentazioni in uso. End point attesi:

1. valutazione dell'Errore Totale Analitico (ETA), del bias di calibrazione e del Coefficiente di Variazione (CV) del dosaggio della creatinina in ciascun laboratorio.
  2. formula personalizzata per la correzione del bias
  3. studio di correlazione dei metodi
  4. calcolo corretto della eGFR usando la formula MDRD.
- Conclusioni. Questo progetto rappresenta l'esempio di implementazione di un metodo per la standardizzazione e la correlazione dei dati di creatinina sierica per il calcolo della eGFR.

Scientific committee: Adorisio E, Antonetti R, Armenise E, Bozza L, Cera G, Conserva R, Correale M, De Santis A, Di Rienzo G, Di Serio F, Fumarulo R, Grossi B, Lanzillotto C, Lobreglio G, Maglione F, Saltarelli G, Santini S, Saponaro M, Scoditti M, Tundo S, Vaira A.

**Bibliografia**

1. Komeda P, Beaulieu M, Soccombe D, et al. Regional Implementation of Creatinine Measurement Standardization J Am Soc Nephrol 2008;19:164-9.

232

**PROTEOMIC ANALYSIS TO UNRAVEL THE FUNCTION OF HUMAN RIBOSOMAL PROTEIN S19**

M. Caterino<sup>1</sup>, S. Orrù<sup>2</sup>, A. Aspesi<sup>3</sup>, M. Armiraglio<sup>3</sup>, I. Dianzani<sup>3</sup>, M. Ruoppolo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli

<sup>2</sup>Fac. di Scienze Motorie, Università di Napoli "Parthenope" e Fondazione SDN, Napoli

<sup>3</sup>IRCAD Dip. di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara

<sup>4</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Napoli

Diamond-Blackfan Anemia (DBA) is a congenital aplastic anemia that selectively involves the erythroid compartment. It has been established that 25% of DBA patients bear a mutated allele of gene encoding the ribosomal protein S19 (Rps19). The finding that RPS19 mutations suppress the expression of the allele has suggested that haploinsufficiency is the main cause of abnormal erythropoiesis in DBA patients. However, some patients carry missense mutations in the RPS19 gene. Rps19 translocates from cytoplasm to the nucleus where it participates to ribosome biogenesis. Recent data suggested that DBA is due to a general defect of protein synthesis in a highly proliferating tissue. Using a functional proteomic approach we have recently defined that Rps19 interacts with multiple proteins involved in the ribosome biogenesis and function: NTPases, hydrolases/helicases, isomerases, kinases, splicing factors, structural constituents of ribosome, transcription factors, transferases, transporters, DNA/RNA-binding protein species, dehydrogenase, ligase, peptidase receptor protein, translation elongation factor (1). Conversely, comparative proteomics tools were used to look at the proteins involved in Rps19 mediated pathways. A DIGE (Differential Gel Electrophoresis) experiment was performed on cellular lysates from human erythroleukemia cell line TF-1 in which expression of RPS19 was reduced using siRNA against RPS19 mRNA and from control TF-1 cell line. Differentially regulated proteins were identified by mass spectrometry tools and analysed using Ingenuity Pathway software.

**Reference**

1. Orrù S, Aspesi A, Armiraglio M, et al. Mol Cell Proteomics 2007;6(3):382-93.

233

**VALORI DI RIFERIMENTO IN GRAVIDANZA DI AST, ALT, GAMMA-GT, LDH, CK ED ALFA-AMILASI RIFERIBILI ALLA STANDARDIZZAZIONE IFCC**G. Cattozzo<sup>1</sup>, C. Albeni<sup>1</sup>, A. Calonaci<sup>1</sup>, E. Guerra<sup>2</sup>, F. Ceriotti<sup>2</sup><sup>1</sup>Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese<sup>2</sup>Diagnostica e Ricerca S. Raffaele SpA, IRCCS S. Raffaele, Milano

Lo stato di gravidanza è fisiologicamente associato ad adattamenti del metabolismo che possono determinare variazioni della concentrazione di alcuni componenti del sangue. Scopo di questo lavoro è definire i valori di riferimento in gravidanza degli enzimi del siero determinati con metodi basati sulla standardizzazione IFCC. Sono stati analizzati campioni di siero prelevati da 234 gestanti al secondo trimestre di gravidanza, di età compresa tra 17 e 43 anni (media 29,1; deviazione standard 5,9; mediana 29,5); sulla base dei risultati di un pannello standard di esami ematochimici veniva esclusa la presenza di insufficienza renale, diabete mellito e malattie epatiche o pancreatiche. I valori di AST, ALT,  $\gamma$ -GT, LDH, CK ed  $\alpha$ -amilasi venivano misurati con metodi basati sulla standardizzazione IFCC, utilizzando il sistema analitico Olympus AU680. L'accuratezza dei valori di AST, ALT,  $\gamma$ -GT, LDH e CK veniva verificata analizzando, per ciascun metodo, 3 pool di sieri con valore assegnato mediante procedimento analitico di riferimento IFCC: per tutti i metodi e per tutti i pool di sieri la differenza tra valore trovato e valore assegnato risultava inferiore alle specifiche desiderabili per l'errore totale ammissibile derivate dalla variabilità biologica. Per nessuno degli enzimi considerati si osservava variazione della concentrazione di attività catalitica dipendente dall'età. Per AST, ALT,  $\gamma$ -GT e CK la distribuzione dei valori nella popolazione considerata non risultava essere di tipo gaussiano. Gli intervalli di riferimento venivano definiti utilizzando metodi statistici non parametrici per calcolare, per ciascun enzima, il valore dei percentili 2,5 e 97,5 ed i rispettivi intervalli di confidenza al 90 % (CI). Gli intervalli di riferimento risultavano essere i seguenti: AST, da 10 (CI 9 – 11) a 34 U/L (CI 31 – 37); ALT, da 7 (CI 6 – 8) a 43 U/L (CI 39 – 47);  $\gamma$ -GT, da 4 a 25 U/L (CI 20 – 33); LDH, da 115 (CI 102 – 119) a 205 U/L (CI 199 – 216); CK, da 22 (CI 17 – 25) a 147 U/L (CI 119 – 161);  $\alpha$ -amilasi, da 33 (CI 23-35) a 110 U/L (CI 108 – 124). Per ALT,  $\gamma$ -GT e LDH tali intervalli di riferimento differivano da quelli proposti per le femmine nei rispettivi procedimenti analitici di riferimento IFCC.

234

**VARIABILITA' BIOLOGICA DELLA CISTATINA C**M.S. Graziani<sup>1</sup>, L. Zanolla<sup>2</sup>, G. Gambaro<sup>4</sup>, T. Yabarek<sup>3</sup>, G. Righetti<sup>1</sup>, M. Marini<sup>1</sup>, M.G. Anselmi<sup>1</sup>, L. Zanardi<sup>1</sup>, R. Patuzzo<sup>1</sup>, A. Strazzer<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona<sup>2</sup>Div. Clinicizzata di Cardiologia, Università di Verona<sup>3</sup>Div. di Nefrologia, Università di Verona<sup>4</sup>Div. di Nefrologia, Università Cattolica, Roma

**Introduzione.** La variabilità biologica di un analita è un parametro importante da considerare quando si debba valutare la sua utilità. La Cistatina C è proposta per il monitoraggio della funzionalità renale sia come concentrazione plasmatica sia quale parametro delle formule per il calcolo della velocità di filtrazione renale. Scopo di questo lavoro è quello di misurare la variabilità intraindividuale della Cistatina C in tre diversi gruppi di soggetti al fine di verificare se l'età sia un parametro che influenza tale variabilità.

**Metodi.** Sono stati arruolati complessivamente 30 soggetti suddivisi in tre gruppi di età: 8 con età tra 20 e 30 anni, 10 con età tra 40 e 60, 12 con età superiore a 60; il rapporto tra maschi e femmine è 1:1 in tutti e tre i gruppi. I campioni sono stati raccolti per 4 settimane successive mantenendo costante un certo numero di variabili (giorno, ora del prelievo, prelevatore, condizione fisiche del soggetto), conservati a -80 °C ed analizzati in doppio in una unica seduta analitica secondo il classico schema per la stima della variabilità biologica. Le misure sono state effettuate in nefelometria (Immagine, Beckman Coulter). I valori sono stati analizzati mediante analisi standard della varianza.

**Risultati.** Le medie in mg/L (DS, CV%) nei tre gruppi sono 0.72 (0,03; 2,8); 0.88 (0,03; 3,1); 1.37 (0,03; 2,4). La variabilità intraindividuale (CVi) e il Reference Change Value (RCV) nei tre gruppi risultano rispettivamente 6,1%; 7,2% e 3,3% e 20%, 22%, 12%

**Discussione.** Da alcuni anni la Cistatina C viene proposta per la valutazione e per il monitoraggio nel tempo della funzionalità renale. In questo contesto, conoscere la sua variabilità biologica è importante per un corretto uso del parametro. I dati da noi ottenuti confermano una variabilità intraindividuale simile a quella riportata in letteratura. L'età elevata sembra essere un fattore in grado di diminuire il CVi, in presenza di concentrazioni plasmatiche medie più elevate. L'entità contenuta del CVi e del RCV, rende la Cistatina C vantaggiosamente utilizzabile nel monitoraggio temporale della funzionalità renale.

**Bibliografia**

Delanaye P, Cavalier E, Depas G et al. New data on the intraindividual variation of Cistatin C. *Nephron Clin Pract* 2008;108:c246-8.

235

**DIVERSO COMPORTAMENTO DI CISTATINA C E NGAL IN NEONATI CON ALTERAZIONI FUNZIONALI RENALI SECONDARIE A CHIRURGIA CARDIOTORACICA**

R. Luciano<sup>1</sup>, M. Muraca<sup>1</sup>, Z. Ricci<sup>2</sup>, C. Garisto<sup>2</sup>, I. Favia<sup>2</sup>, E. Misirocchi<sup>1</sup>, S. Picardo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>2</sup>Terapia Intensiva Cardiocirurgia, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

L'Insufficienza Renale Acuta (IRA) è una grave complicanza della chirurgia cardiaca pediatrica. La diagnosi precoce di IRA è fondamentale per il successo della terapia. Cistatina C (CC) e Neutrophil-Gelatinase Associated Lipocaline (NGAL) sono stati proposti come biomarcatori sensibili e specifici di IRA (1, 2). Il nostro lavoro ha valutato i due marcatori in 26 neonati di età compresa tra 0 e 45 gg sottoposti a chirurgia cardiotoracica.

15 pazienti sono stati trattati con un farmaco protettore della funzionalità renale (Fenoldopam), mentre 11 costituivano il gruppo di controllo. Gli indici ematici di funzione renale (creatinina, CC e NGAL) sono stati determinati al tempo 0 (inizio intervento), 1 (fine intervento) e 2 (24h post operatorie). La creatinina è stata determinata mediante metodo di Jaffe, la CC con Nefelometria, NGAL con ELISA. L'analisi statistica è stata eseguita con test di Mann-Whitney e di Kruskal-Wallis. I risultati sono espressi come Medie  $\pm$  ES. Tutte le significatività sono intese come  $p < 0.05$ . Un paziente nel gruppo di controllo ha sviluppato IRA con necessità di dialisi. I valori basali di creatinina, CC e NGAL erano simili nei due gruppi; la creatinemia è aumentata significativamente al tempo 1 solo nei controlli ( $0.69 \pm 0.05$  vs  $0.48 \pm 0.06$ ). NGAL è aumentata significativamente al tempo 1 sia nel gruppo trattato ( $87.73 \pm 7.21$  vs  $58.26 \pm 5.94$ ) che nel gruppo di controllo ( $105.91 \pm 12.40$  vs  $73.09 \pm 10.11$ ), si è normalizzata al tempo 2 nei trattati ( $79.73 \pm 8.37$ ), mentre permaneva elevata nei controlli ( $109.82 \pm 13.91$ ); il test non dimostrava nessuna differenza significativa tra i due gruppi. La CC tendeva ad aumentare, ma non significativamente, al tempo 2 sia nei trattati ( $1.08 \pm 0.05$  vs  $0.95 \pm 0.04$ ) che nei controlli ( $1.44 \pm 0.12$  vs  $1.14 \pm 0.09$ ); i livelli di CC erano significativamente più elevati nei controlli rispetto ai trattati. Questi risultati suggeriscono che CC e NGAL dovrebbero essere usati in associazione per monitorare la funzione renale in pazienti pediatrici sottoposti a chirurgia cardiotoracica.

**Bibliografia**

1. Mishara J et al, Lancet 2005.
2. Koyner JL et al, International Society of Nephrology 2008.

236

**DETERMINAZIONE DI Tau, p-Tau e Beta AMILOIDE 1-42 NEL LIQUOR ED EFFICACIA PREDITTIVA NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE PRECOCE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA DI ALZHEIMER ED ALTRE DEMENZE NON-ALZHEIMER**

A. Scognamiglio<sup>1</sup>, M. Tondelli<sup>2</sup>, P. Nichelli<sup>2</sup>, T. Trenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Patologia Clinica, Lab. di Patologia Clinica, Tossicologia e Diagnostica Avanzata- NOSAE, Modena

<sup>2</sup>Dip. Neuroscienze-NOSAE, Modena

Scopo dello studio è verificare l'utilità della determinazione di Tau, p-Tau e beta amiloide in soggetti con diagnosi incerta di MA, di demenza frontotemporale, o altre demenze.

Metodi. La determinazione quantitativa di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$  è stata effettuata con test ELISA (Innotest Innogenetics) e strumentazione Biomeck 3000 (Beckman Coulter). Una funzione Macro Microsoft Excel aumenta il potere di discriminazione utilizzando il parametro IATI (INNOTEST amyloid-tau index) che combina graficamente le concentrazioni di Tau e  $\beta A_{1-42}$  con la concentrazione di p-Tau<sub>181</sub>. L'elaborazione grafica distingue i pazienti in affetti da MA, normali e indicativi per demenza non Alzheimer. Il protocollo di studio segue le indicazioni STARD.

Risultati. Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$  sono stati determinati nel liquor di 33 pazienti con età compresa tra 43-84aa (15F e 18M) inseriti nello studio in modo sequenziale per diagnosi incerta o complessa di demenza. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione neurologica, esami ematici di routine, ECG, valutazione neuropsicologica completa, RM encefalo e spettroscopia, PET, indagini genetiche. I pazienti studiati sono stati rivisti approssimativamente dopo un anno e la diagnosi definitiva è stata utilizzata come golden standard. In 8 dei 33 vi è una totale concordanza dello IATI index e diagnosi finale di MA. In 22 dei 33 pazienti non vi è stato un quadro di MA confermando diagnosi diverse. In 3 pazienti non vi è stata concordanza con la valutazione clinic-strumentale. In 6 dei 33 pazienti con sospetto clinico di FTD, solo il 50% dei casi è stato confermato dall'elaborazione grafica (demenza non AD). In tutti i casi di FTD, il rapporto  $\beta A_{1-42} / p-Tau_{181}$  risulta superiore ad un cut off di 7 utile per confermare un sospetto clinico di AD. Sono stati inclusi nello studio 35 pazienti con diagnosi di non demenza suddivisi in 3 gruppi di età. In 27 dei 34 pazienti l'elaborazione dei biomarcatori concorda con una diagnosi non-MA.

Conclusioni. La ricerca evidenzia che l'algoritmo predittivo, rappresenta un valido supporto alla diagnosi precoce di MA e nella diagnosi differenziale quando comparato od associato alla rivalutazione clinico strumentale dopo un anno, utilizzata come golden standard.

237

**RELATIONSHIP BETWEEN FETUIN-A AND KIDNEY FUNCTION DECLINE IN ELDERLY**

C. Bellia<sup>1</sup>, G. Bivona<sup>1</sup>, C. Carru<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>2</sup>, R. Tomaiuolo<sup>3</sup>, A. Ruocco<sup>3</sup>, G. Castaldo<sup>3</sup>, M. Ciaccio<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

<sup>2</sup>*Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari, Italia*

<sup>3</sup>*CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia; Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, 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  $93,7 \pm 6,9$  years, with 65% female. The mean value of cystatin C was  $1,4 \pm 0,6$  mg/l, while fetuin-A serum levels were  $0,38 \pm 0,13$  g/l. Moreover, subjects with at least one S allele had lower fetuin-A levels ( $P < 0,001$ ). 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.

238

**VALUTAZIONE DI MARKERS PROTEICI IN PAZIENTI TRAPIANTATI DI RENE**

F. Cerroni<sup>2</sup>, G. Ferranti<sup>1</sup>, G. Salerno<sup>1</sup>, C. Ialongo<sup>1</sup>, M.T. Corsetti<sup>1</sup>, F. Tabacco<sup>2</sup>, L. Portaro<sup>2</sup>, D. Di Bernardini<sup>2</sup>, F. Capogreco<sup>1</sup>, G. Ranungolo<sup>1</sup>, A. Ceccarelli<sup>1</sup>, P. Cardelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*II° Facoltà Medicina e Chirurgia Università Sapienza di Roma*

<sup>2</sup>*Az. Ospedaliera S'Andrea di Roma*

**Scopo del lavoro.** Determinare markers proteici di compromissione biologica in soggetti sottoposti a trapianto di rene in trattamento con Ciclosporina (6-12 mg/kg/die).

**Materiali e metodi.** Sono stati arruolati 10 soggetti (6 maschi e 4 femmine) in terapia di mantenimento immunosoppressiva. I pazienti sono stati monitorati a 24 ore dopo la somministrazione del farmaco (T0) ed a 3 ore dall'assunzione successiva (T1), eseguendo su campioni di sangue periferico i dosaggi di: Ciclosporina (Integra 400, Roche); Cistatina C (BNII Siemens); Proteina C ultrasensibile hs-PCR, Lipoproteina Apo A, Lipoproteina Apo B, frazione del complemento C3 e C4 (Vitros Fusion 5.1, Johnson & Johnson). I dati sono stati analizzati con test non parametrici per la mediana (Mann-Whitney) e correlazione di Pearson mediante SPSS v.17, con un livello di significatività  $p < 0,05$ .

**Risultati.** La media dei valori della Cys C è risultata superiore ma non statisticamente significativa, al tempo T1 rispetto al tempo T0 ( $1,45 \pm 0,18$  mg/dL vs  $1,39 \pm 0,18$  mg/dL;  $r = 0,98$ ); la hs-PCR è risultata inferiore al tempo T1 ( $0,32 \pm 0,15$  mg/dL vs  $0,07 \pm 0,06$  mg/L;  $p = 0,001$ ); l'Apo A è aumentata al tempo T1 ( $171 \pm 26,7$  mg/dL vs  $151 \pm 23,7$  mg/dL;  $r = 0,98$ ); l'Apo B ha subito un incremento al tempo T1 ( $111,2 \pm 15,5$  mg/dL vs  $81,3 \pm 12,4$  mg/dL;  $p = 0,001$ ); il C3 è risultato superiore al tempo T1 ( $140, 1 \pm 20, 6$  mg/dL vs  $111, 5 \pm 18, 3$  mg/dL;  $p = 0,002$ ) ed il C4 ha subito una diminuzione al tempo T1 ( $24,7 \pm 4,5$  mg/dL vs  $32,3 \pm 21,5$  mg/dL). **Discussione e Conclusione.** Il mantenimento, nel corso del trattamento, della concentrazione ematica di Cys C indica la conservazione della funzionalità renale mentre la diminuzione della hs-PCR è indicativa di una riduzione sia dell'attività infiammatoria che della probabilità di rigetto. L'aumento significativo delle Apo B e del C3 depone a favore di un'alterazione dell'assetto lipidico ed incrementa la possibilità di coinvolgimenti vascolari e/o metabolici. I parametri analizzati in aggiunta alla Cys C, potrebbero essere adottati come pannello per la valutazione del rischio di insorgenza di disordini correlati agli indici molecolari analizzati. L'estensione dello studio alle adipochine, servirà a chiarire i meccanismi alla base delle osservazioni preliminari ottenute.

**Bibliografia**

Deleuze S et al, *Transplant Proc* 2006;38:2311-3.

239

**CONTENUTO DI FERRO, ZINCO E ALLUMINIO NELLA FERRITINA DI PAZIENTI IPERFERRITINEMICI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CRONICO: CONFRONTO CON ALTRI PAZIENTI IPERFERRITINEMICI E CON DONATORI NORMOFERRITINEMICI**

C. Rossi<sup>1</sup>, P.L. Spada<sup>2</sup>, A. Alimonti<sup>5</sup>, B. Bocca<sup>5</sup>, B.M. Ricerca<sup>4</sup>, M.G. Bocci<sup>3</sup>, C. Vulpio<sup>2</sup>, M. Chiarpotto<sup>1</sup>, P. De Sole<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. di Biochimica Clinica, UCSC, Roma

<sup>2</sup>Ist. di Clinica Chirurgica, UCSC, Roma

<sup>3</sup>Ist. di Anestesiologia e Rianimazione, UCSC, Roma

<sup>4</sup>Ist. di Ematologia, UCSC, Roma

<sup>5</sup>Ist. Superiore di Sanità, Roma

Introduzione. Questo lavoro descrive il contenuto specifico di ferro, zinco ed alluminio della ferritina in quattro gruppi di pazienti: 1) Pazienti iperferritinemici emodializzati (HF-HD); 2) Pazienti settici (HF-SE); 3) Pazienti emocromatosici (HF-HE); 4) Donatori (BD).

In un precedente lavoro (1) abbiamo dimostrato che la ferritina di pazienti in emodialisi ha un basso contenuto di ferro e mostra una correlazione inversa con la ferritinemia. Lo scopo di questo studio è verificare l'ipotesi che la ferritina dei pazienti dializzati contenga altri metalli oltre il ferro. A tal fine, è stato misurato il contenuto di zinco, alluminio, manganese, cadmio e piombo nei quattro gruppi di pazienti.

Materiali e Metodi. Pazienti: 13 pazienti dializzati, 14 pazienti settici, 16 pazienti emocromatosici, con ferritina plasmatica superiore a 300 ng/ml, 10 pool di plasma ottenuti da 100 donatori.

Metodi. La ferritina è stata separata tramite immunoprecipitazione e gli ioni metallici presenti nella ferritina vengono misurati con spettrometria di massa (1).

**Risultati**

1) la ferritina ha un elevato contenuto di Al, Fe e Zn mentre non sono presenti Mn, Cd e Pb. (circa 7000 atomi/molecola nei donatori e 2000 atomi/molecola nei pazienti iperferritinemici);

2) il rapporto Al:Fe:Zn è ca 11:2:1 nei donatori; e, rispettivamente, 15:3:1, 5:6:1 e 3:3:1 nei pazienti HF-HD, HF-SE e HF-HE.

Discussione. I risultati ottenuti indicano che il basso contenuto di ferro dei pazienti emodializzati è dovuto ad un aumento del contenuto specifico di Al. Inoltre, la presenza di Al e Zn, in aggiunta al ferro, ridimensiona il ruolo della ferritina quale molecola di deposito di Fe e suggerisce un ruolo regolatore di ioni metallici redox attivi.

**Bibliografia**

1. Spada PL et al. Clin. Biochem. 2008;41:997-1001.

240

**DETERMINAZIONE DI AST ED ALT CON METODI BASATI SULLA STANDARDIZZAZIONE IFCC CHE PREVEDONO L'AGGIUNTA DI PIRIDOSSAL-5'-FOSFATO IN CUVETTA DI REAZIONE**

G. Cattozzo<sup>1</sup>, C. Albeni<sup>1</sup>, A. Calonaci<sup>1</sup>, A. Nauti<sup>1</sup>, C. Franzini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

<sup>2</sup>Università degli Studi, Milano

Nella determinazione di AST ed ALT l'aggiunta di piridossal-5'-fosfato (P5P) consente l'attività catalitica di tutte le molecole enzimatiche; l'errore della misura della concentrazione di attività catalitica in assenza di P5P è di entità imprevedibile. Di contro, l'aggiunta di P5P ai reagenti ne riduce la stabilità. I moderni analizzatori automatici capaci di eseguire analisi con metodi a 3 reagenti permettono di aggiungere P5P alla miscela di reazione in cuvetta anziché ai reagenti. Scopo di questo lavoro è valutare l'accuratezza di metodi per la determinazione di AST ed ALT basati sulla standardizzazione IFCC e caratterizzati dall'impiego di P5P sotto forma di soluzione da aggiungere in cuvetta. Le analisi venivano eseguite con il sistema analitico Olympus AU680, impiegando metodi che prevedevano l'aggiunta di una soluzione di P5P in cuvetta (metodi AST3R ed ALT3R) e metodi che prevedevano l'aggiunta del P5P ai reagenti (metodi AST2R ed ALT2R). L'imprecisione è stata valutata analizzando 5 replicati in ciascuna di 5 serie analitiche giornaliere. Per AST3R l'imprecisione totale (come CV) era rispettivamente 1,5 % e 0,8 % alle concentrazioni di 43 e 126 U/L; per ALT3R l'imprecisione era 2,6 % e 1,3 % alle concentrazioni di 41 e 121 U/L: gli obiettivi ottimali di imprecisione derivati dalla variabilità biologica erano costantemente rispettati. L'analisi della regressione (non-parametrica) dava  $y = x$  ( $r = 0,9999$ ) quando 106 sieri da pazienti (SP) con AST nell'intervallo 9 – 606 U/L venivano analizzati con AST3R (y) ed AST2R (x) e  $y = 0,988x - 0,5$  U/L ( $r = 0,9999$ ) quando 103 SP con ALT nell'intervallo 3 – 403 U/L venivano analizzati con ALT3R (y) ed ALT2R (x). Le differenze (AST2R – AST3R) nell'analisi dei SP erano comprese tra -3 e 2 U/L (mediana e primo quartile 0,0 U/L; terzo quartile 1,0 U/L); le differenze (ALT2R – ALT3R) erano comprese tra -2 e 9 U/L (mediana e terzo quartile 1,0 U/L; primo quartile 0,0 U/L). I reagenti risultavano stabili nel tempo: in 28 giorni, sia per AST3R che per ALT3R, i risultati di analisi eseguite quotidianamente su aliquote di 2 pool di sieri a differente concentrazione conservate a -80 °C utilizzando sempre il medesimo reagente non mostravano tendenza a variazione.

241

**IFE-PENTA AND HRE AS SCREENING METHODS IN BENCE JONES PROTEIN RESEARCH**

G. Cigliana<sup>1</sup>, U. Basile<sup>2</sup>, B. Frollano<sup>1</sup>, F. Gulli<sup>2</sup>, E. Curti<sup>1</sup>, M. Di Nunno<sup>2</sup>, P. Amboni<sup>3</sup>, A. Vernocchi<sup>4</sup>, L. Conti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Patologia Clinica, Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena", Roma

<sup>2</sup>Immunologia, Istituto Patologia Generale, Università Cattolica "Sacro Cuore", Roma

<sup>3</sup>Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti di Bergamo"

<sup>4</sup>Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Ospedale Treviglio Caravaggio", Bergamo

**Introduction.** Immunofixation techniques are widely accepted as the reference methods in investigating the Bence Jones protein (BJ) in urine. Concerning immunofixation procedures SEBIA has developed and validated a screening method to evaluate the presences of serum monoclonal component using pentavalent antisera, a mixture of anti-IgG, IgA, IgM, anti-Kappa and Lambda which can be applied to each single gel track.

**Aim.** The aim of this study was to test the SEBIA pentavalent antisera on urine samples using the IFE-Penta as a screening method and comparing it to the HRE electrophoretical screening method and using the gold standard BJ-IFE as a reference method.

**Methods.** Two different laboratories, one from a private university hospital and the other from a public oncologic health institute, have collaborated in this study performing the first HRE/BJ-IFE protocol and the second IFE-Penta/BJ-IFE protocol. 24 hour-urine samples were collected from 863 patients (460M and 403F) aged between 18 to 99. To improve the sensitivity, samples were concentrated between 10 to 50 fold. In all methods, SEBIA instruments and materials were applied, and IFE-Penta and BJ-IFE gels were run using the same BJ predefined protocol. Statistical analysis was performed using the "STAT-SOFT STATISTICA" programme.

**Results.** IFE-Penta/BJ-IFE protocol demonstrated to have higher sensitivity, reducing false negative results vs HRE/BJ-IFE protocol. Although both protocols are useful for rapid screening, 12 samples are loaded on IFE-Penta gel and 15 samples on HRE gel whereas 4 samples on BJ-IFE gel, only the IFE-Penta/BJ-IFE protocol allow to reduce the false negative rate optimizing the number of positive samples to be confirmed by the BJ-IFE.

**Conclusion.** This study showed that there was a greater correlation between IFE-Penta vs BJ-IFE, when compared to HRE vs BJ-IFE. This close association is due to the fact that IFE-Penta and BJ-IFE are both Immunofixation methods while HRE is an electrophoretic method. IFE-Penta by using a pentavalent antisera and producing antigens immunoprecipitation is more sensitive than HRE and it better correlates to BJ-IFE reference method.

242

**ATTIVITA' DELLA gamma-GLUTAMMIL TRANSFERASI DEL SIERO IN DIFFERENTI PATOLOGIE**

A. Montanelli<sup>1</sup>, S. Brambilla<sup>1</sup>, E. Corsi<sup>1</sup>, S. Valaperta<sup>1</sup>, C. Franzini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Cliniche, IRCCS Istituto Clinico Humanitas

<sup>2</sup>Università degli Studi di Milano

Le concentrazioni nel sangue dell'enzima ubiquitario GGT (gamma glutammil transferasi, EC 2.3.2.2) appaiono aumentate in differenti patologie di diversi organi (Crit Rev Clin Lab Sci 2001: 3-55. Biochim Clin 2009: 9-58). Per portare ulteriori conoscenze a questo aspetto, in vista del possibile significato diagnostico di aumenti dell'enzima del siero, abbiamo recuperato dall'archivio elettronico alcuni dati, inclusa la attività della GGT del siero, relativi a 9714 pazienti degenti nel periodo 01/2005 – 12/2008. Ciascun paziente è stato assegnato ad uno dei seguenti gruppi di patologie: A = malattie cerebrovascolari; B = ipertensione arteriosa; C = arterio- e capillaropatie; D = ischemie miocardiche; E = insufficienza cardiaca; F = malattie dell'apparato digerente, secondo i criteri International Classification of Diseases.

Le misurazioni di concentrazione di attività catalitica (espresse in U/L) sono state effettuate con un procedimento conforme alle raccomandazioni IFCC. Per ciascun gruppo le distribuzioni statistiche dei valori osservati appaiono assai asimmetriche; di seguito sono riportati i principali parametri descrittivi di tali distribuzioni espressi come GGT (U/L) al 50°, 68° e 97° percentile rispettivamente: A 31, 45 e 252; B 31, 45 e 324; C 32, 47 e 262; D 35, 47 e 230; E 47, 76 e 337; F 67, 146 e 1236.

Per gli scopi di questo lavoro si è considerato un unico limite superiore di riferimento (LSR) pari a 54 U/L (Clin Chem 2005: 1232-40). Per ciascun gruppo si sono quindi calcolati il numero di valori superiori a LSR (e la relativa percentuale), con i seguenti risultati: A: 316 (26 %), B: 21 (18 %), C: 262 (24 %), D: 943 (26 %), E: 339 (43 %), F: 1521 (55 %).

L'insieme dei risultati elaborati sottolinea il differente comportamento dei valori aumentati di GGT in relazione al gruppo di patologie. La marcata asimmetria di distribuzione all'interno di ciascun gruppo induce ad ipotizzare la possibilità che ogni gruppo includa più sottogruppi, ciascuno con la sua particolare distribuzione. I risultati qui ottenuti possono pertanto rappresentare un punto di partenza per lo svolgimento di ulteriori indagini atte a favorire una migliore comprensione delle relazioni esistenti tra concentrazione dell'enzima e patologia in atto.

243

### DETERMINAZIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA DEL SIERO: ARMONIZZAZIONE DEI RISULTATI FORNITI DAI METODI AMP E DEA MEDIANTE IMPIEGO DI CALIBRATORI COMMUTABILI

G. Cattozzo<sup>1</sup>, C. Albeni<sup>1</sup>, A. Nauti<sup>1</sup>, C. Franzini<sup>2</sup><sup>1</sup>Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese<sup>2</sup>Università degli Studi, Milano

La misura della concentrazione di attività catalitica della fosfatasi alcalina (ALP) del siero è utilizzata per la diagnosi delle malattie epatobiliari e delle malattie del tessuto osseo con aumentata attività degli osteoblasti. I metodi più utilizzati per la determinazione dell'ALP forniscono valori non confrontabili e differiscono principalmente per il tipo di soluzione tampone: ammino-metil-propanolo (AMP) e dietanolammina (DEA). Scopo di questo lavoro è valutare la possibilità di armonizzare i valori forniti dai metodi AMP e DEA utilizzando calibratori commutabili. Abbiamo analizzato con entrambi i metodi 106 sieri da pazienti (SP), con valori di ALP compresi tra 32 e 507 U/L (metodo AMP), e 8 materiali di calibrazione (MC), utilizzando un sistema analitico Olympus AU680. I risultati ottenuti con DEA nell'analisi dei SP venivano ricalcolati, utilizzando un MC commutabile ed un MC non-commutabile con valori assegnati mediante AMP, ottenendo due gruppi di risultati. Per ciascun gruppo di risultati si valutavano statisticamente la distribuzione delle differenze [(valore originale DEA)-(valore AMP)] e [(valore ricalcolato DEA)-(valore AMP)] e la distribuzione dei rapporti [(valore originale DEA)/(valore AMP)] e [(valore ricalcolato DEA)/(valore AMP)]. Dopo ricalibrazione con MC commutabile la mediana delle differenze DEA-AMP passava da 195 a 0 U/L, mentre dopo ricalibrazione con MC non-commutabile diventava 124 U/L; in seguito a ricalibrazione con MC commutabile la mediana dei rapporti DEA/AMP passava da 2,47 a 1,00, mentre dopo ricalibrazione con MC non-commutabile diventava 1,94. In seguito a ricalibrazione con MC commutabile, la differenza inter-quartile delle differenze DEA-AMP si riduceva da 207 a 2 U/L e la differenza tra i centili 97,5 e 2,5 passava da 559 a 12 U/L. Dopo ricalibrazione con MC commutabile un valore di ALP pari al valore di riferimento superiore diveniva superiore (da 120 a 121 U/L) ed un valore di poco superiore rientrava nell'intervallo di riferimento (da 121 U/L a 114 U/L); per effetto della ricalibrazione con MC non-commutabile 33 valori inferiori a 120 U/L divenivano superiori. In conclusione, l'impiego di MC commutabili permette di armonizzare i risultati forniti dai metodi DEA e AMP nell'analisi dei SP.

244

### EPIDEMIOLOGIA NUTRIZIONALE E GENETICA PER LA VALUTAZIONE DEI PROFILI DI RISCHIO DI UNA POPOLAZIONE DI DONNE SANE E IN ETÀ FERTILE

A.E. Marchese<sup>1</sup>, M. Barchitta<sup>2</sup>, V. Frontini<sup>1</sup>, R. Marzagalli<sup>2</sup>, M. Sciacca<sup>1</sup>, G. Valenti<sup>2</sup>, L. Chinnici<sup>1</sup>, A. Agodi<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica, Osp. S. Bambino, Catania<sup>2</sup>Dip. Scienze Biomediche, Università Catania

Scopo/obiettivi. Il ruolo protettivo dell'assunzione di acido folico e le evidenze scientifiche relative sono state descritte da molti anni. L'acido folico ha un importante ruolo nel metabolismo degli aminoacidi, nella sintesi degli acidi nucleici e metilazione del DNA, ciò ha indirizzato la ricerca sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati e sui polimorfismi dei geni che li codificano, tra questi uno dei più studiati è il gene codificante l'enzima 5,10-metilene-tetraidrofolato reductasi (MTHFR) che presenta molti single nucleotide polymorphisms (SNP) tra cui i più frequenti sono C677T e A1298C. È stato condotto uno studio di tipo cross-sectional per valutare lo stato nutrizionale di una popolazione di donne in età fertile ed l'assunzione di folato in relazione ai polimorfismi del gene MTHFR e all'età.

Metodologia. In un semestre sono state valutate 204 donne in età fertile afferenti al Laboratorio dell'Ospedale S. Bambino di Catania. I dati relativi allo stato socio-demografico-clinico e all'uso di supplementi sono stati raccolti da epidemiologi, utilizzando un questionario costruito ad hoc. L'assunzione di folati, nel corso dell'ultimo mese, è stata stimata mediante un FFQ semiquantitativo. La carenza di folati è stata stimata comparando l'assunzione quotidiana con la dose media raccomandata (Estimated Average Requirements - EAR). La determinazione dei polimorfismi C677T e A1298C del gene MTHFR è stata eseguita mediante Real-Time PCR.

Risultati. I risultati di questo studio hanno evidenziato una elevata prevalenza della carenza di folati e un aumento della frequenza del polimorfismo mutato C677T, che in altri studi, è stato associato ad alcuni vantaggi selettivi in seguito al trattamento con vitamine e folati durante la gravidanza. Inoltre, altri studi riportano una ridotta metilazione del DNA nelle donne con il genotipo mutato TT, che hanno un più elevato fabbisogno di folati rispetto ai controlli CC, ma solo con livelli bassi di folati.

Conclusione. Data l'elevata prevalenza del genotipo mutato 677TT nelle donne catanesi, rispetto ad altri gruppi di popolazione, si può avere un più elevato fabbisogno di folati e aumento della suscettibilità alle complicanze osteetriche e alle malattie croniche in condizioni di inadeguatezza di folati.

245

### PLASMA AMINOTHIOL LEVELS IN NORMAL PREGNANCY AFTER FOLIC ACID SUPPLEMENTATION

M.C. Gueli<sup>1</sup>, A. Auci<sup>2</sup><sup>1</sup>Dip. Scienze Biochimiche, Facoltà di Medicina, Università di Palermo<sup>2</sup>C.L. in Ostetricia, AOUP "Paolo Giaccone", Facoltà di Medicina, Università di Palermo

Homocysteine (Hcy) is a sulphur-containing nonprotein amino acid that stand at the junction of two metabolic pathways: remethylation and transsulfuration. A physiological reduction in plasma tHcy, enhanced by folic acid supplementation (FAS), occurs during normal human pregnancy. Cysteine (Cys) is the only non essential sulfhydryl-containing amino acid in proteins and is the limiting reagent for GSH synthesis. One role for GSH in nervous system is to act as a free radical scavenger, for the ROS generated by glutamate-induced oxidative stress. Hcy may cross the maternal-fetal barrier driven by a concentration gradient but it cannot be converted into Cys by the fetus because of an absence of Cystathionase (CS) activity during human pregnancy. Thus, in the human development CS activity does not appear until after birth. However, neurones are dependent upon glial Cys for GSH synthesis. The CNS is therefore more susceptible to oxidative stress than any other tissue. Our aim was to define the plasma levels of aminothiols in the different trimesters of normal pregnancy after FAS.

Participants were thirty healthy pregnant women (aged 16-30 years) supplemented with folic acid (400 µg/day) and 30 nonpregnant women. Plasma samples were obtained respectively at 6-12 (first trimester), 13-25 (second trimester) and 26-38 (third trimester) weeks of gestation. Plasma aminothiol levels were determined by Waters-HPLC system as described previously.

We soon confirmed a significant decrease of tHcy since the first trimester of normal pregnancy ( $5.85 \pm 0.42$  µmol/L) compared to nonpregnant women ( $8.7 \pm 1.4$  µmol/L). In pregnant women, a significant decrease of tCys and GSH is already found from the first trimester ( $197.30 \pm 7.17$  and  $5.44 \pm 0.351$  µmol/L, respectively). The concentration decrease of tCys is persistent in the second trimester and becomes maximal in the third one ( $167 \pm 5.69$ ;  $150.70 \pm 8.78$  µmol/L, respectively) after FAS. Therefore, Cys appears to be an essential amino acid in the fetus in the absence of an alternative pathway for its supply to the neurones. Together, these results point out the importance of transsulfuration pathway in women throughout the pregnancy after FAS.

#### Reference

Henshel DS. *Toxicol Sci* 2004;81:257-9.

246

### VARIAZIONI DEI LIVELLI SIERICI DI OMOCISTEINA IN CORSO DI IMA

A. Peruzzini<sup>1</sup>, G. Pegoretti<sup>1</sup>, A. Sicà<sup>1</sup>, A. Valentini<sup>2</sup><sup>1</sup>Lab. di Patologia Clinica Ospedale S.Chiera, Trento<sup>2</sup>Serv. di Fisica Sanitaria Ospedale S.Chiera, Trento

L'omocisteina (Hcy) è uno dei marcatori di elezione dello stato funzionale dei vasi sanguigni, molto utilizzato e oggi di facile esecuzione analitica. Si propone una valutazione delle variazioni quantitative plasmatiche di Hcy, relativo al danno dell'endotelio vasale, in conseguenza all'evento infartuale confrontando in particolare i dosaggi della tropoina t (Trop T) in parallelo ai dosaggi dell'Hcy eseguiti nel corso dell'evento infartuale.

Lo studio è stato condotto su campioni di 21 pazienti con IMA a vari livelli di gravità, accertabile sulla base del dato quantitativo relativo alla Trop T. Ha fatto seguito sugli stessi campioni un analogo monitoraggio dell'Hcy. L'andamento speculare delle due curve, rispettivamente di Trop T e Hcy, ricavate dal monitoraggio si presenta analogo per tutti i pazienti, in particolare nel caso dei pazienti con livelli di Trop T più elevati; nella maggior parte dei pazienti il valore minimo raggiunto dall'Hcy si associa al massimo valore raggiunto dalla Trop T, nello stesso intervallo temporale. Si formulano due ipotesi per spiegare il fenomeno che è comunque sempre presente nel corso del monitoraggio della Hcy nei pazienti con IMA. La prima ipotesi è collegabile all'utilizzo di farmaci quali N-acetilcisteina e penicillamina. In condizioni normali l'Hcy reagisce con l'ossido nitrico (NO), fattore di rilassamento endoteliale e sostanza capace di determinare proprietà antiaterosclerotiche dell'endotelio formando un nitroso-tiolo dotato di attività vasodilatatrice che prolunga la breve azione dell'NO. L'NO neutralizza l'Hcy, che viene a trovarsi in difetto nel corso del monitoraggio ma che torna a risalire non appena venga sospesa la somministrazione dei farmaci. Una seconda ipotesi può riguardare un'accentuata produzione di creatina. La creatina, tra le varie funzioni, svolge anche un ruolo attivo nel ciclo energetico ATP-ADP. L'apporto energetico è essenziale per la contrazione muscolare e quindi anche per quella del miocardio. In caso di infarto cardiaco diventa probabile, in generale, che sia richiamata una maggiore quantità di creatina-fosfato per compensare la riduzione dell'apporto energetico. Infatti è stato trovato che la creatina-fosfato svolge un'azione protettiva nell'infarto sperimentale e nelle aritmie da occlusione coronaria. Il 50% della creatina viene sintetizzata dal fegato e nel pancreas utilizzando arginina, glicina e metionina come substrati. Una maggiore richiesta di creatina si tradurrebbe pertanto in un maggior consumo di S-adenosil-metionina, che verrebbe sottratta al ciclo di utilizzo della metionina, che va a ridurre così la produzione di Hcy. Una conclusione concreta deriva dall'osservazione che ha portato a definire una variazione accentuata dell'Hcy nel corso di IMA che è tanto più elevata quanto più massivo è il grado dell'infarto stesso.

#### Bibliografia

Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-246.

247

**STATUS VITAMINICO E PROFILO LIPIDICO IN SOGGETTI FORTI FUMATORI ASINTOMATICI**

R. De Giuseppe<sup>1</sup>, C. Novembrino<sup>2</sup>, F. de Liso<sup>1</sup>, L. Vigna<sup>3</sup>, M. Pellegatta<sup>3</sup>, R. Maiavacca<sup>4</sup>, F. Bamonti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Mediche, Univ. degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E. Milano

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Neurologiche, Univ. degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E. Milano

<sup>3</sup>U.O. Medicina del Lavoro 1 Clinica del Lavoro L. Devoto, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E. Milano

<sup>4</sup>Lab. di Patologia Clinica, Dip. Area Servizi Diagnostici, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E. Milano

Il deficit di cobalamina e/o folato porta ad iperomocisteinemia che, come il fumo, è un fattore indipendente di rischio cardiovascolare.

Scopo dello studio è stato quello di valutare l'influenza del fumo di sigaretta sul metabolismo dell'omocisteina (Hcy) ed il profilo lipidico. In 61 forti fumatori asintomatici (35M; età 40-60 anni; >20 sigarette/die) sono state valutate le concentrazioni ematiche di Hcy, folato, vitamina B12 e olotranscobalamina (HoloTC, frazione attiva della B12) utilizzando i rispettivi kit commerciali su analizzatore automatizzato AxSYM (Abbott, USA); l'analisi del profilo lipidico è stata eseguita su analizzatore Modular Analytics (Roche, Swiss). I risultati sono stati valutati statisticamente mediante test di Wilcoxon.

I soggetti analizzati mostravano un alterato metabolismo dell'omocisteina: Hcy >10.5 µM nel 56% dei casi, valori di folato sia sierico sia eritrocitario al di sotto dell'intervallo di riferimento (<7nM e <421nM, rispettivamente) nel 52.5% dei casi, diminuita concentrazione di B12 nel 15% dei casi, livelli di HoloTC al di sotto del cut-off (>40pM) nel 30% dei casi. È stata evidenziata un'ipercolesterolemia (elevati valori di colesterolo totale e di colesterolo-LDL nel 75% e 57%, rispettivamente) insieme ad un decremento dei valori di colesterolo-HDL in circa il 50% dei soggetti. Inoltre, sono state rilevate delle differenze significative (p<0.05) nei due sessi: frequenza di iperomocisteinemia più alta negli uomini (68%) rispetto alle donne (27%), stato carenziale della cobalamina (B12<180pM e HoloTC <40pM) più frequente negli uomini (17% e 34%, rispettivamente) che nelle donne (11.5% e 23%, rispettivamente), concentrazioni di colesterolo-HDL maggiori nelle donne rispetto agli uomini i quali presentavano anche una frequenza maggiore di bassi livelli di questo analita.

Il presente studio conferma l'impatto negativo del fumo di sigaretta, più evidente nel sesso maschile, sui parametri da noi analizzati e l'importanza di una loro valutazione al fine di prevenire complicanze cardiovascolari in soggetti asintomatici, ma esposti a diversi fattori di rischio.

**Bibliografia**

Howard G et al. JAMA 1998;279:119.

248

**CORRELAZIONE TRA I VALORI SIERICI DELLA PROCALCITONINA E DELLA PCR NELLE FLOGOSI DELL'ETA' PEDIATRICA: RISULTATI PRELIMINARI DELLA NOSTRA CASISTICA**

L. Marinelli<sup>1</sup>, E. Dimitri<sup>2</sup>, L. Perini<sup>2</sup>, M. Dottori<sup>2</sup>, M. Biagioni<sup>2</sup>, C. Venturini<sup>1</sup>, F. Bordicchia<sup>1</sup>, S. De Crescenzo<sup>2</sup>, G. D'Angelo<sup>2</sup>, M. Tocchini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Ospedale G. Salesi, Azienda Ospedali Riuniti di Ancona

<sup>2</sup>Clinica Pediatrica, Università Politecnica delle Marche

Il dosaggio ematico della Procalcitonina (PCT) rappresenta un test valido nella diagnosi delle infezioni e delle flogosi. Il vantaggio, rispetto alla PCR, è un precoce innalzamento in fase acuta e una rapida normalizzazione alla guarigione, permettendo al clinico di discriminare tra eziologia virale e batterica (1).

Abbiamo dosato la PCT in 19 bambini (12#e7#) ricoverati per febbre, per confrontarne l'accuratezza diagnostica con quella della PCR, al momento dell'ammissione ed in fase di remissione. La PCR è stata determinata con analizzatore ADVIA Siemens (Immunoturbidimetria) (cut-off 0,6 mg/dl); la PCT utilizzando il kit VIDAS (ELFA) con i seguenti cut-off: < 0,05 ng/ml: assenza di infezione; < 0,5: basso rischio; 0,5-2: rischio moderato; 2-10: alto rischio; >10: sepsi.

I 19 pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi: 1) infezioni batteriche, 2) infezioni virali e 3) infiammazioni, correlando i due test per sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN). Riguardo la sensibilità la PCT è risultata più accurata nelle infezioni virali (50vs25%), mentre, riguardo la specificità, la PCT è superiore alla PCR nelle infezioni batteriche (50vs30%) e nelle infiammazioni (100vs80%). Il VPP è maggiore per la PCT rispetto alla PCR nei 3 gruppi considerati, mentre il VPN è inferiore per la PCT nel gruppo 1 (83vs100%). Si evince quindi che la PCT ha una accuratezza migliore per quanto riguarda la specificità ed il VPP, mentre la sensibilità è superiore solo nei pazienti del gruppo 2. Si è evidenziato per la PCT, tranne in due casi ad eziologia non batterica, un precoce innalzamento ed una più rapida normalizzazione rispetto alla PCR.

La PCT rappresenta un test efficace nell'approccio diagnostico delle infezioni, presentando una superiore accuratezza diagnostica nel monitoraggio clinico rispetto alla PCR. I risultati sono in linea con i dati della letteratura, anche se sono auspicabili ulteriori contributi casistici.

**Bibliografia**

1. Buzzetti R et al. Nuove opportunità diagnostiche in pediatria: la procalcitonina. *Prospettive in Pediatria* 2006;36:11-22.

249

**DOSAGGIO DI BETA-CTX NEL SIERO IN CLINICA ODONTOIATRICA**

R. Maiavacca<sup>1</sup>, G.B. Grossi<sup>2</sup>, I. Felicetta<sup>1</sup>, N. Failla<sup>1</sup>, F. Napolitano<sup>1</sup>, E. Baldisseri<sup>2</sup>, C. Mirelli<sup>2</sup>, E. Torresani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fond. Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

<sup>2</sup>Clinica Odontoiatrica, Fond. Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

$\beta$ CTx è costituito dai telopeptidi C-terminali isomerizzati specifici della degradazione del collagene di tipo I e rappresenta un valido marcatore di riassorbimento osseo utile anche nel monitoraggio della terapia con farmaci antiassorbitivi come i bifosfonati.

Noi utilizziamo il test immunologico  $\beta$ Crosslaps/serum specifico per i frammenti di collagene di tipo I isomerizzati e a legame crociato. La specificità del test è garantita dall'impiego di due anticorpi monoclonali.

Per la definizione dei valori di riferimento abbiamo dosato  $\beta$ CTx su campioni di siero di 100 femmine e 100 maschi, provenienti dalla popolazione di donatori afferenti al nostro SIMT, di età compresa tra 30 e 50 anni. I valori ottenuti in pg/ml sono  $314 \pm 144$  per le femmine e  $370 \pm 124$  per i maschi.

In Clinica odontoiatrica l'osteonecrosi dei mascellari correlata all'uso dei bifosfonati (BRONJ) è una realtà patologica di relativa recente acquisizione, ma di grande attualità. Si tratta di una patologia invalidante la cui prevenzione e diagnosi precoce coinvolge odontoiatri, chirurghi maxillofacciali e specialisti delle aree cliniche in cui vengono prescritti i bifosfonati. Alcuni recenti studi hanno preso in considerazione i valori di  $\beta$ CTx nel siero per valutare il rischio di BRONJ nei pazienti che hanno assunto o assumono bifosfonati e devono essere sottoposti ad interventi di chirurgia orale fino alla formulazione di linee guida che, a seconda dei valori di  $\beta$ CTx, identificano i livelli di rischio di sviluppare osteonecrosi:

$\beta$ CTx in pg/ml <100 alto rischio;>100<150 medio rischio;>150 basso rischio. Al fine di valutare i pazienti della Clinica Odontoiatrica della Fondazione sulla base della recente letteratura è stato dosato il  $\beta$ CTx in 56 pazienti in terapia con bifosfonati di cui 16 in terapia ev, 8 in terapia im/os da più di 48 mesi e 32 in terapia im/os da meno di 48 mesi. I valori ottenuti in pg/ml sono:  $73.19 \pm 27.2$  per il primo;  $164.13 \pm 18.34$  per il secondo e  $348.56 \pm 115.09$  per il terzo gruppo. I dati preliminari, da confermare con un più ampio gruppo di pazienti ed un follow up nel tempo sono suggestivi di una stratificazione del rischio a seconda del tipo e della durata della terapia con bifosfonati.

Bibliografia

R.E. Marx J Oral Maxillofac Surg 67:107-119 2009 Suppl1

250

**RIDUZIONE DELLA SPESA ANTIBIOTICA SOTTO LA GUIDA DELLA PROCALCITONINA**

R. Rosmarini<sup>1</sup>, F. Viventi<sup>1</sup>, S. Cipriani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Patologia Clinica Osp. Profili Fabriano ASUR Zona Territoriale 6

Scopo della ricerca. La Procalcitonina è il proormone dal cui taglio proteolitico viene prodotta la Calcitonina delle cellule C tiroidee. In seguito a infezioni la Procalcitonina viene ritrovata intatta nel plasma e il suo dosaggio permette di individuare precocemente le infezioni batteriche; valori superiori a 0.50 ng/ml indicano l'elevata probabilità di una infezione e quindi la necessità di intraprendere terapia antibiotica; al contempo, sotto l'indicazione di un valore di Procalcitonina inferiore al cut off, è possibile evitare la somministrazione di antibiotici non necessari con il vantaggio di una riduzione dei costi e di evitare lo sviluppo di ceppi antibioticoresistenti.

Risultati. Nella ricerca effettuata sono stati evidenziati nel corso di tre mesi 250 pazienti con Procalcitonina negativa (inferiore al cut off scelto di 0.50 ng/ml) ma con parametri aspecifici di infiammazione alterati (PCR > 20 mg/l, VES >40 e conta dei globuli bianchi > 11000 x mmc).

La misurazione della Procalcitonina è stata effettuata su siero mediante metodica immunoenzimatica BRAHMS PCT con strumento semiautomatico VIDAS Biomerieux.

In questi pazienti, dopo aver discusso i casi clinici con i medici di reparto, non sono state intraprese terapie antibiotiche giudicate non necessarie. Questo iter ha dimostrato un forte impatto economico e clinico traducendosi in una diminuzione del consumo di antibiotici pari al 24% con notevole riduzione dei costi, dei tempi di degenza e nello sviluppo di ceppi batterici antibioticoresistenti.

E' perciò evidente che il dosaggio in laboratorio della procalcitonina apporta notevoli vantaggi indicando precocemente infezioni batteriche e migliorando sia la gestione del paziente che l'appropriatezza della terapia antibiotica.

Bibliografia

1. Rosmarini R, Viventi F, Cipriani S. La Procalcitonina: un aiuto nella diagnosi e nel trattamento delle infezioni batteriche. Pandora 2009; 58:45-50.

2. Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. Clin Chim Acta 2002; 323:17-29

251

### UTILITÀ CLINICA DEL DOSAGGIO DELLA PROCALCITONINA

M. Brugia<sup>1</sup>, V. Scocco<sup>1</sup>, C. Nitti<sup>2</sup>, A. Salvi<sup>2</sup>, M. Tocchini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Biochimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedali Riuniti, Ancona

<sup>2</sup>Medicina Generale, Azienda Ospedali Riuniti, Ancona

Scopo di questo lavoro è stato di valutare l'utilità della procalcitonina (PCT), in relazione con altri parametri, in pazienti critici con sospetta infezione per verificare l'efficacia clinica.

Materiali e Metodi. In uno studio retrospettivo (01/12/2007 – 01/01/2009) abbiamo studiato 389 pazienti critici ricoverati presso U.O. di Medicina in cui era stato determinato il valore di PCT mediante metodo ELFA (Vidas Brahms Biomerieux).

Per ciascun paziente è stato calcolato il New Simplified Acute Physiology Score (SAPSII) e le diagnosi sono state fatte valutando numerosi parametri clinici e strumentali.

Risultati. L'età media dei pazienti era 73,3 anni, il 26,2 % era in stato di shock, SAPS II medio era 34,8, mortalità stimata 20,4%. Infezione batterica è stata diagnosticata nel 77,1% dei pazienti (shock settico 15,8%, polmonite 50,5%, colecistite 3,6%, epiema pleurico 1,4%, altra infezione 28,7%); patologia non infettiva in 22,9% dei casi (embolia polmonare 7,3%, SCA 9,7%, scompenso cardiaco 20,8%, altra diagnosi 62,2%).

Considerando il valore di PCT > 0,25 ng/ml come positivo, PCT è risultata aumentata nel 59,9% dei pazienti con infezione batterica.

Confrontando PCT e somministrazione di antibiotici (considerando appropriata la somministrazione se PCT > 0,25 ng/ml) è stata trovata discordanza nel 37,8%. Dal riesame di questi casi la decisione medica è stata ritenuta non corretta in 52 casi su 136 (38,2%): 50 pazienti avevano ricevuto antibiotici con PCT < 0,25 ng/ml e senza IB, 2 non avevano ricevuto terapia con PCT > 0,25 e IB.

Con un cut-off di 0,25 ng/ml la sensibilità 0,89 e specificità 0,33, con un cut-off di 5ng/ml

La sensibilità è 0,9 con una specificità 0,26.

La mortalità totale è stata 19,3%; correlata alla PCT: PCT < 0,25 ng/ml 9,4%, 0,25-5 ng/ml 23,3%, 5-10 ng/ml 39,3%, > 10 ng/ml 32,1% senza una significativa differenza tra i pazienti con infezione batterica e non.

Conclusioni. I nostri dati confermano che nel paziente critico la PCT è un marker diagnostico sensibile per infezioni batteriche e può aiutare la scelta terapeutica.

252

### PRO-CALCITONINA (PCT) E PUNTEGGI DI GRAVITÀ (SAPS II E SOFA) IN PAZIENTI CRITICI

C. Callà<sup>1</sup>, C. Rossi<sup>1</sup>, L. Montini<sup>2</sup>, M.L. Gozzo<sup>3</sup>, M. Calabrese<sup>4</sup>, M. Chiarpotto<sup>1</sup>, P. De sole<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Biochimica Clinica, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma

<sup>2</sup>Ist. di Anestesiologia e Rianimazione, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma

<sup>3</sup>Lab. di Patologia Clinica, Osp. m.G. Vannini, Roma

<sup>4</sup>Ist. di Cardiologia, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma

Scopo. I sistemi a punteggio codificati, SAPS II (Simplified Acute Physiology Score) e SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) considerando variabili sia fisiologiche che cliniche, permettono di valutare la gravità e la probabilità di morte dei pazienti ricoverati nei reparti di Terapia Intensiva consentendo di instaurare tempestivamente le terapie più idonee. La concentrazione plasmatica della Procalcitonina (PCT) viene utilizzata quale parametro per discriminare la SIRS dalla Sepsis. Scopo di questo lavoro è quello di valutare se la capacità diagnostica dei sistemi a punteggio può essere potenziata dall'associazione con la valutazione dei livelli ematici della PCT.

Metodi. Sono stati studiati quarantacinque pazienti, ricoverati presso il reparto di Rianimazione del Policlinico A. Gemelli, di cui 15 con sepsi, 15 con sepsi grave e 15 con shock settico. Il punteggio SAPS II è stato calcolato entro le prime 24 ore dall'ammissione in reparto, mentre quello SOFA è stato stimato contestualmente all'esecuzione del dosaggio della PCT ematica. La PCT è stata determinata con un metodo immunologico ELFA (BRAHMS) utilizzando un'analizzatore VIDAS (BIOMERIEUX). Per l'analisi statistica sono stati utilizzati il test di Mann-Whitney e la valutazione della curva ROC.

Risultati. Non è stata osservata una correlazione tra la concentrazione ematica di PCT e la gravità della sepsi stimata in base ai punteggi SAPS II e SOFA. Invece la PCT e gli schemi a punteggio codificati si sono rivelati idonei a discriminare la sepsi dallo shock settico ( $p < 0,001$ ). L'analisi della curva ROC ha evidenziato che i valori di cut-off di PCT e SOFA che meglio discriminano i pazienti con sepsi da quelli con shock settico sono rispettivamente 0,79 ng/ml e 10 ( $AUC \pm SE 0,86 \pm 0,07$  e  $AUC \pm SE 0,92 \pm 0,05$  rispettivamente).

Conclusioni. I risultati ottenuti, pur con tutte le limitazioni dovute all'esiguo numero dei pazienti finora da noi studiati, stimolano a prendere in considerazione la valutazione congiunta del punteggio degli schemi codificati e della concentrazione ematica della PCT. al fine di differenziare la sepsi dallo shock settico nei pazienti critici, Bibliografia

Jensen JU et al. Crit. Care Med 2006;34 2596-602.

253

**A LOCAL BIOMARKER, SIALIDASE ACTIVITY, FOR SCREENING OF PREGNANT WOMEN**S. Cauci<sup>1</sup>, J. Culhane Flatow<sup>2</sup><sup>1</sup>*Dept. Biomedical Sciences and Technologies, School of Medicine, University of Udine, Udine, Italy*<sup>2</sup>*Dept. Obstetrics and Gynecology, Drexel University College of Medicine, and Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, USA*

**Background and Aims.** Preterm birth (PTB) remains the leading cause of perinatal mortality and long-term morbidity and occurs in approximately the 7-12% of pregnancies. The main problem for the obstetrician is the inability to detect women at risk of this complication early in gestation. Thus, development of an objective assessment of women at elevated risk of PTB is currently one of the major goal in obstetrics. The difficulty is due to the fact that PTB results from multiple factors. Inflammation in the upper genital tract, which is mainly associated to infection, is considered the main cause of PTB, and especially of early PTB. There is evidence that lower vaginal tract infections may progress to intra-uterine infection and/or inflammation. Bacterial vaginosis (BV) is a lower vaginal tract disorder that is moderately but not specifically associated with increased risk of adverse birth outcomes. There is a clear need for further studies in the selection of women with abnormal vaginal flora to tailor treatment intensity in pregnant women.

**Methods.** We assessed if vaginal fluid sialidase activity (a microbial enzyme objectively detectable in vaginal fluid of women with BV) in early pregnancy (mean 12 weeks' gestation) predicts adverse birth outcomes among BV positive women.

**Results.** Elevated sialidase at 60th percentile levels [relative risk (RR) 1.40 (95% CI 1.01-1.94)], and 90th percentile levels [RR 2.16 (95% CI 1.48-3.15)] cut points was significantly more frequent in BV positive women who then had a delivery before 37 weeks' gestation. Elevated sialidase activity levels at the highest cutpoint were more frequent in women who later had a spontaneous early preterm birth, OR 5.36 (95% CI 1.77-16.23) and late miscarriage, OR 8.33 (95% CI 2.57-26.9).

**Conclusions.** Elevated sialidase in early pregnancy is strongly associated with a composite variable of all adverse preterm outcomes. The association is particularly strong with spontaneous early preterm births and late miscarriages. Our research assessed that sialidase measurement is a valuable tool to solve the problem of which BV positive women to choose for intervention trials and thus potentially our findings will permit to reduce the rate of preterm birth due to infection.

254

**HPLC DETERMINATION OF LUTEIN ABSORPTION IN PREMATURE INFANTS**J. Gervasoni<sup>1</sup>, S. Persichilli<sup>1</sup>, F. Iavarone<sup>1</sup>, C. Romagnoli<sup>2</sup>, E. Zecca<sup>2</sup>, C. Tirone<sup>2</sup>, G. Barone<sup>2</sup>, C. Zuppi<sup>1</sup><sup>1</sup>*Dept. of Clinical Chemistry, Catholic University of the Sacred Heart, Rome*<sup>2</sup>*Dept. of Paediatrics, Catholic University of the Sacred Heart, Rome*

**Background.** Lutein and zeaxanthin are two carotenoids mainly located in the neuronal retina and play a role in protecting it against oxidative and light damages. Humans cannot synthesize lutein or zeaxanthin, so diet is the only source of these compounds and human milk is the only source for the neonate. Concentrations of carotenoids are significantly lower in cord blood than in the mothers (0.05 vs 0.33  $\mu\text{mol/L}$  for lutein and 0.01 vs 0.08  $\mu\text{mol/L}$  for zeaxanthin). Moreover, in the formula-fed infants the values of  $\beta$ -carotene were significantly lower than those measured in infants at birth and those in breast-fed babies, while  $\alpha$ -carotene was undetectable in all formula-fed infants.

In this study we evaluate intestinal absorption of lutein in preterm infants in the early neonatal period and measure lutein and zeaxanthin plasma levels after oral lutein administration in preterm infants.

**Methods.** Lutein was given orally in a single dose of 0.5 mg/kg to 10 preterm infants with mean birth weight of 1785 grams and mean gestational age of 32.6 weeks. Lutein was administered at a mean age of 52 hours of life. EDTA plasma lutein and zeaxanthin concentrations were measured before lutein administration and 6, 24, 48, and 120 hrs after the administration. Refrigerated plasma samples, after deproteinization with sodium dodecyl sulfate, were extracted with hexane and the upper layer was transferred into glass vials and evaporated to dryness. The residue was redissolved in absolute ethanol and injected into the HPLC. HPLC analysis was performed according to Yeum et al. The method is linear in the patho-physiological range and total imprecision was lower than 10% at low and high concentration.

**Results.** All infants had detectable levels of lutein (0.361  $\mu\text{mol/L}$ ) and zeaxanthin (0.126  $\mu\text{mol/L}$ ) before treatment. Lutein concentration increased by 13.5% at 6 hrs and by 16.7% at 24 hrs after the administration, and returned to the basal level at 120 hrs after the treatment. Zeaxanthin remained unchanged during the study period.

**Conclusions.** The clinical impact of increasing plasma lutein concentration on macular development and visual function needs further investigation and the HPLC method may offer a simple and reliable method for lutein absorption evaluation.

255

**BIOMARKERS DISCOVERY OF EARLY RENAL ALTERATIONS UTILIZING PROTEOMIC ANALYSIS**

T. Ozben<sup>1</sup>, A. Tomasi<sup>1</sup>, S. Bergamini<sup>2</sup>, S. Bellei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochemistry Dept. Medical Faculty, Akdeniz University, Antalya, Turchia

<sup>2</sup>Dip. ad attività integrata Laboratori, Anatomia Patologica e Medicina legale, Università di Modena e Reggio Emilia

Background. Nephropathy associated with diabetes is a complication that cause slow deterioration of kidneys, leading to end-stage renal disease. Despite rapid research progress, predictors able to assess prospectively with high precision the risk for diabetic nephropathy in individuals with diabetes are still lacking.

Methods. The aim of the present study was the discovery, and the subsequently identification, of potential urine biomarkers of early renal alterations in type 2 diabetes mellitus (T2D). We performed urinary proteomic analysis of 10 normoalbuminuric patients with T2D, 12 patients with type 2 diabetic nephropathy (T2DN), and 12 healthy subjects as normal controls. Proteins were separated by bidimensional electrophoresis (2-DE) and identified by mass spectrometry analysis.

Results. Comparing the patients proteomic profiles with those of normal subjects, we identified 11 gradually differently changed proteins. Precisely, the decreased proteins were the prostatic acid phosphatase precursor, the ribonuclease and the kallikrein-3. On the contrary, eight proteins were progressively increased in both patients groups: plasma retinol-binding protein, transthyretin precursor, carbonic anhydrase 1, beta-2-microglobulin precursor, beta-2-glycoprotein 1 and three different type of Ig kappa chain (C region, V-III region SIE, V-II region Cum or Bence-Jones protein).

Conclusions. The main result of our study is the finding of alterations in urinary proteins, not only in T2DN but also in T2D patients with microalbuminuria in the normal range. These patterns of urinary proteins might represent a potential tool for a better understanding of diabetic renal damage and could help future studies aimed to identify patients at increased risk of kidney disease progression.

256

**ELEVATI LIVELLI PLASMATICI DI DIMETILARGININA ASIMMETRICA (ADMA) NEI PAZIENTI CON SPONDILITE ANCHILOSANTE: STUDIO CROSS-SECTIONAL CASO CONTROLLO**

C. Carru<sup>1</sup>, G. Erre<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, E.

Pisanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, P. Fenu<sup>2</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, G. Passiu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari

<sup>2</sup>Cattedra di Reumatologia, Università Sassari

La spondilite anchilosante (AS) è una malattia infiammatoria sistemica gravata da una riduzione dell'aspettativa di vita principalmente legata all'incremento della morbilità e mortalità cardiovascolari aterosclerotiche. Un gran numero di evidenze scientifiche ha recentemente sottolineato il ruolo della dimetilarginina asimmetrica (ADMA), inibitore endogeno della ossido nitrico-sintetasi, nel promuovere la disfunzione endoteliale e il processo aterosclerotico. È stato condotto uno studio cross-sectional per valutare se i livelli plasmatici di ADMA nei pazienti affetti da AS siano elevati rispetto alla popolazione generale in maniera indipendente dai fattori di rischio cardiovascolare tradizionali. Nello studio sono stati inclusi 17 pazienti affetti da AS (10 M, 7 F, 39 ± 11 anni, con durata media di malattia di 114 ± 108 mesi), classificati secondo i criteri modificati di New York ed esenti da malattia cardiovascolare e altrettanti controlli sani [incrociati per sesso, età (± 5 anni) e fattori di rischio cardiovascolare]. Il dosaggio dei derivati metilati dell'arginina è stato eseguito in elettroforesi capillare. Nei pazienti con AS i livelli plasmatici di ADMA risultavano significativamente più elevati rispetto ai controlli 0.65 ± 0.10 µmoli/L nei pazienti vs 0.54 ± 0.07 µmoli/L nei controlli, p = 0.001). L'analisi bivariata eseguita nel campione complessivo mostrava una significativa associazione tra i livelli plasmatici di ADMA e la presenza della AS (r = 0.541, p = 0.002), la BMI (r = 0.387, p = 0.024) il sesso femminile (r = 0.478, p = 0.004) e i livelli di VES e PCR (r = 0.501, p = 0.003 e r = 0.387, p = 0.032 rispettivamente). Nel modello di regressione multipla la BMI, il sesso femminile e la presenza della AS rendevano conto di almeno un terzo della variazione dell'ADMA (R = 0.787, R<sup>2</sup> = 0.620, AR<sup>2</sup> = 0.582, #R<sup>2</sup> = -0.031, F = 16.318, p = 0.000). Lo studio suggerisce per la prima volta che nei pazienti affetti da AS i livelli di ADMA siano elevate rispetto alla popolazione generale e che tale elevazione sia almeno in parte correlate all'infiammazione sistemica caratteristica della malattia.

257

**STUDIO CASO-CONTROLLO DELL'ATTIVITA' E DEL POLIMORFISMO DELLA PARAOXONASI (PON1) IN PAZIENTI CON INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO**

S. Iona<sup>1</sup>, C. Cortese<sup>1</sup>, P. Ceravolo<sup>1</sup>, V. Quartuccio<sup>1</sup>, S. Muscoli<sup>1</sup>, A. Pierantozzi<sup>1</sup>, L. Liberatoscioli<sup>1</sup>, P. Casalino<sup>1</sup>, M.T. Calì<sup>1</sup>, R. Massoud<sup>1</sup>, G. Federici<sup>1</sup>, F. Romeo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina Interna, Cattedra di Biochimica Clinica e Cattedra di Cardiologia, Università di Roma, "Tor Vergata"

**Introduzione.** La paraoxonasi è un esterasi/lattonasi presente a livello delle lipoproteine ad alta densità (HDL) coinvolta nella prevenzione della ossidazione delle LDL e HDL sia in vivo che in vitro attraverso l'idrolisi dei perossidi di lipidi. Inoltre il polimorfismo genetico della PON1 192Q/R risulta essere associato sia all'attività enzimatica che al rischio cardiovascolare.

**Scopo.** Misurare i livelli circolanti della PON1 (attività paraoxonasi, arilesterasi e tiolattonasi), la proteina C reattiva ad alta sensibilità (hsPCR) e il profilo lipidico in pazienti con infarto del miocardio in fase acuta rispetto ad una popolazione di controllo anche in relazione al polimorfismo 192Q/R.

**Metodi.** Le attività enzimatiche della PON1 sono state determinate su 104 pazienti e 58 controlli spettrofotometricamente utilizzando il paraoxone, il fenilacetato e il  $\gamma$ -tiobutirrolattone come substrati mentre il genotipo è stato determinato attraverso protocolli di estrazione di DNA e di PCR convenzionali

**Risultati.** I valori medi di tiolattonasi nei pazienti e nei controlli risultano rispettivamente di 183 e 206 U/L ( $p=0.018$ ). Tale attività, quando normalizzata per i valori dell'arilesterasi, che riflettono la massa delle HDL, mostra una  $p = 0.001$ . Tali differenze statistiche si mantenevano anche dopo stratificazione per genotipo Q/R. L'attività paraoxonasi in presenza di NaCl mostra valori per i casi e per controlli rispettivamente di 328 e 213 U/L ( $p=0.001$  paraoxonasi/arilesterasi). Anche in questo caso la differenza si manteneva dopo stratificazione per genotipo. Nei pazienti il test di Spearman mostra una correlazione tra la hsPCR e l'attività paraoxonasi ( $r=0.20$ ,  $p=0.039$ ).

**Conclusioni.** Questo studio ha evidenziato che nei pazienti con infarto acuto del miocardio esiste una significativa riduzione dei livelli circolanti dell'attività tiolattonasi e un significativo incremento dell'attività paraoxonasi confermando l'indicazione come biomarker nella patologia cardiaca. La PCR ad alta sensibilità sembra associarsi all'attività paraoxonasi durante la fase acuta.

258

**VALORE PROGNOSTICO DELLE FORMULE DI STIMA DEL FG NELLA POPOLAZIONE DI PAZIENTI CON MRC DELLO STUDIO MAURO**

D. Leonardi<sup>1</sup>, F. Mallamaci<sup>1</sup>, M. Postorino<sup>1</sup>, G. Enia<sup>1</sup>, A. Itri<sup>2</sup>, P. Gasparone<sup>2</sup>, G. Tripepi<sup>1</sup>, C. Zoccali<sup>1</sup>, e il Gruppo di Studio MAURO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR-IBIM e Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto di Rene, Az. Osp. BMM di Reggio Calabria

<sup>2</sup>Lab. di Patologia Clinica, Az. Osp. BMM di Reggio Calabria

**Introduzione.** Le linee guida K-DOQI raccomandano l'uso di equazioni di stima del Filtrato Glomerulare (FG) basate sulla creatinina per la stadiazione della malattia renale cronica (MRC). Recentemente sono state pubblicate varie formule di stima del FG basate sulla cistatina C. Scoppi. Data l'ampia divergenza tra il FG stimato con le diverse equazioni abbiamo testato la loro predittività in termini di outcome combinato (morte da qualsiasi causa, peggioramento funzione renale/dialisi ed eventi cardio o cerebro-vascolari) in pazienti con MRC.

**Metodi.** Abbiamo studiato una popolazione di 717 pazienti (430M e 287F) affetti da MRC allo stadio 3 con un'età media di  $62 \pm 10$  anni seguiti per un periodo medio di 19 mesi (range 0.2–40 mesi). Il FG è stato stimato con le seguenti formule: Cockcroft-Gault, MDRD<sup>175</sup>, MDRD<sup>186</sup>, CKD-EPI (basate sulla creatinina) e Formula di Rule basata sulla cistatina. Il potere predittivo per l'outcome combinato delle varie formule di stima è stato paragonato attraverso l'analisi dei pesi di Akaike.

**Risultati.** La stima individuale del FG con le diverse formule variava nello stesso individuo in media da 29 a 40 ml/min/1.73mq. Durante il follow-up 210 pazienti hanno avuto l'outcome d'interesse. In un modello di regressione di Cox che includeva età, sesso, diabete, colesterolo, pressione arteriosa sistolica, terapia antipertensiva, emoglobina, albumina ed eventi cardiovascolari pregressi tutte le stime del FG predicevano in maniera significativa l'outcome combinato ( $p < 0.001$ ) ed un aumento di 1 ml/min/1.73mq si associava ad una riduzione del rischio di circa il 4%. Tuttavia l'analisi dei pesi di Akaike evidenziava che il modello di Cox che includeva il FG stimato con la cistatina aveva il 94% di probabilità di essere il migliore modello predittivo tra tutti quelli considerati, seguito dal modello che includeva il FG stimato con la formula CKD-EPI (3.8%), l'MDRD<sup>175</sup> (1.9%), l'MDRD<sup>186</sup> (0.11%) ed infine la f. di Cockcroft-Gault (0.004%).

**Conclusioni.** I dati dimostrano che la stima del FG con la cistatina è quella che meglio predice gli esiti clinici avversi. Il valore clinico di questa più alta predittività deve essere testato in studi che misurino il peso di questo teorico vantaggio prognostico nelle decisioni cliniche.

\* Caridi G, Marino F, Parlono G, Puntorieri E, Catalano F, Pisano A, Mafrica A, Bruzzese V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Parisi R, Plutino D, Santoro O, Audino A, Maimone I, Mannino M, Chiarella S, Pinciaroli A, Caglioti A, Natale G, Papalia T, Grandinetti F, Agazio G, Gullo M, Curti C, Fersini S, Buemi M, Garozzo M, Reina A, D'Anello E, Pugliese A, Pinna M, Fabiano F, Palma L, Tramontana D.

259

**DETERMINAZIONE DEI CITRATI URINARI SU AU400 OLYMPUS**

A. Latte<sup>1</sup>, G. Cangiano<sup>1</sup>, M. Russo<sup>1</sup>, F. Forte<sup>1</sup>, E. Di Maina<sup>1</sup>, C.I. Pandelli<sup>1</sup>, M.M. D'Ambrosio<sup>2</sup>, M. Terribile<sup>2</sup>, M. D'Amora<sup>3</sup>, A. Risitano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Patologia Clinica Osp. dei Pellegrini, ASL NA 1

<sup>2</sup>U.O. Nefrologia Osp. dei Pellegrini, ASL NA 1

<sup>3</sup>Lab. Patologia Clinica Osp. degli Incurabili, ASL NA 1

La nefrolitiasi, o calcolosi renale, è caratterizzata dalla formazione, spesso recidivante, di calcoli urinari. La cristallizzazione di alcune sostanze dipende dal grado di saturazione, dal pH e dalla presenza di inibitori.

Questi ultimi, in equilibrio con le sostanze favorevoli la litogenesi (promotori), agiscono adsorbendosi alla superficie dei cristalli inibendo la crescita del calcolo. I dosaggi urinari delle 24 ore dell'inibitore citrato e del promotore ossalato, assieme ad altri parametri biochimici quali calciuria, uricuria, fosfaturia, natriuria, ecc., vengono utilizzati per il monitoraggio e per la prevenzione della calcolosi renale. In considerazione del discreto numero di determinazioni urinarie richieste e dall'U.O. di Nefrologia dell'Ospedale dei Pellegrini – ASL NA1, col presente lavoro si valuta una metodica fotometrica manuale della ditta LTA per il dosaggio della citraturia da noi adattata sull'analizzatore biochimico AU400 della ditta Olympus.

Lo strumento preleva 5 µL di urina e li aggiunge a 200 µL di reagente 1 (liofilo substrato/enzimi ricostituito con 20 mL di tampone Good/LDH). Dopo un'attesa di circa 5 minuti (cicli macchina da 0 a 10), l'analizzatore utilizza 50 µL di reagente 2 (starter liofilo di citrato liasi disciolto con 5 mL di acqua distillata): il risultato si estrapola dopo 27 cicli macchina con una reazione a termine letta a 340 nm e con una lunghezza d'onda secondaria di 410 nm.

La linearità del metodo raggiunge 1,5 g/L.

Nell'intervallo tra 0,05 ed 1,50 g/L di citrati urinari si evidenzia un profilo di imprecisione con un CV <3%. Le prove di recupero, effettuate su diluizione scalari di un campione a titolo elevato di citrati, evidenziano valori tra il 96,0 ed il 105,6% (recupero medio del 104,0%).

La precisione nella e tra le serie, ottenuta servendosi di due controlli a titolo noto della ditta LTA, mostra un CV <3%.

Ottima è la correlazione tra i valori dosati con la metodica automatizzata da noi proposta (x) e quelli estrapolati con il metodo Enzyplus EZA 785+ (y) ( $r = 0,9961$ ;  $y = 1,0072 \cdot x - 0,0011$ ).

**Bibliografia**

Möllering, H. & Gruber, W. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal Biochem* 1966;17:369-76.

260

**EVALUATION OF SENTINEL CH. ASSAYS ON THE ABBOTT ARCHITECT C4000 CLINICAL CHEMISTRY SYSTEM**

M. La Motta<sup>1</sup>, F. Rota<sup>1</sup>, G. Longo<sup>1</sup>, R. Lucini<sup>1</sup>, J. Herzog<sup>2</sup>, H. Troonen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sentinel CH., Milan, Italy

<sup>2</sup>Abbott GmbH & Co. KG, Diagnostics, Delkenheim, Germany

**Objective.** The analytical performance of some assays was evaluated on the recently introduced Abbott Architect c4000. The c4000 is a fully automated analyzer for low-medium volume labs, which together with the Architect i1000 System forms the integrated ci4100 System for immuno- and chemical analysis

**Methodology.** Evaluations were based on a CLSI-derived equivalence protocol. The following acceptance criteria were used: Total Imprecision (TI)  $\leq 10\%$  CV; Linearity  $\pm 20\%$  from current linearity claim; Method Comparison (MC) vs. c16000 correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.975$ , slope = 0.90-1.10. Analytical Measuring Range (AMR) was defined through linearity and sensitivity.

**Results.**

Cholinesterase: TI Max CV% 1.8; AMR from 120 to 24364 U/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 1.00.

Pancreatic Amylase: TI Max CV% 3.4; AMR from 1 to 2254 U/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 1.00.

CK-MB: TI Max CV% 2.3; AMR from 2.94 to 1040.5 U/L; MC:  $n = 100$ ,  $r = 1.00$ , slope = 0.99.

Fructosamine: TI Max CV% 3.2; AMR from 5 to 1004 µmol/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 0.98.

αHBDH: TI Max CV% 2.3; AMR from 2 to 1809 U/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 0.99.

Bile Acids: TI Max CV% 3.7; AMR from 0.3 to 211.3 µmol/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 1.00.

Copper: TI Max CV% 1.8; AMR from 3 to 735 µg/dL; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 1.00.

Dibucaine: TI Max CV% 5.4; AMR from 27 to 15980 U/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 1.00.

Creatinine: Serum: TI Max CV% 1.6; AMR from 0.01 to 43.7 mg/dL; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 1.01;

Lithium: TI Max CV% 3.9; AMR. from 0.050 to 3.387 mmol/L; MC:  $n = 60$ ,  $r = 1.00$ , slope = 0.99.

**Conclusion.** Evaluation data demonstrated equivalence between the c4000 and c16000 analyzers. An excellent correlation was seen in the method comparison between the c4000 vs c16000.

**Reference**

FDA guidance document: "Guidance for Industry and FDA Staff Replacement Reagent and Instrument Family Policy", December 11, 2003.

261

**EVALUATION OF SENTINEL CH. PROTEINS ASSAYS ON THE ABBOTT ARCHITECT C4000 CLINICAL CHEMISTRY SYSTEM**

M. La Motta<sup>1</sup>, F. Rota<sup>1</sup>, G. Longo<sup>1</sup>, R. Lucini<sup>1</sup>, J. Herzog<sup>2</sup>, H. Troonen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sentinel CH., Milan, Italy

<sup>2</sup>Abbott GmbH & Co. KG, Diagnostics, Delkenheim, Germany

**Objective.** The analytical performance of protein assays was evaluated on the recently introduced Abbott Architect c4000. The c4000 is a fully automated analyzer for low-medium volume labs, which together with the Architect i1000 System forms the integrated ci4100 System for immuno- and chemical analysis.

**Methodology.** Evaluations were based on a CLSI-derived equivalence protocol. The following acceptance criteria were used: Total Imprecision (TI)  $\leq 10\%CV$ ; Linearity  $\pm 20\%$  from current linearity claim; Method Comparison (MC) vs. c16000 correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.975$ , slope = 0.90-1.10. Analyte dependent precision was determined using 3-4 control levels. Analytical measurement range (AMR) was defined through linearity and sensitivity.

**Results.**

Kappa Light chain: TI Max CV% 3.4; AMR from 4 to 1427 mg/dL; MC: n = 60,  $r = 1.000$ , slope = 0.99.

Lambda Light chain: TI Max CV% 2.1; AMR from 3 to 939 mg/dL; MC: n = 60,  $r = 0.999$ , slope = 0.97.

Ceruloplasmin: TI Max CV% 6.3; AMR from 0.85 to 72.7 mg/dL; Method Comparison: n = 75,  $r = 0.995$ , slope = 0.94.

Cystatin C: TI Max CV% 2.1; AMR from 0.01 to 8.19 mg/L; MC: n = 80,  $r = 0.998$ , slope = 0.96.

CRP Vario:

CRP High Sensitive application: TI Max CV% 4.7; AMR from 0.01 to 14.60 mg/dL; MC: n = 60,  $r = 1.000$ , slope = 0.98.

CRP Standard: TI Max CV% 1.6; AMR from 0.03 to 31.82 mg/dL; MC: n = 60,  $r = 1.000$ , slope = 0.99.

CRP Wide Range: TI Max CV% 1.6; AMR from 0.01 to 46.66 mg/dL; MC: n = 60,  $r = 1.000$ , slope = 0.98.

**Conclusion.** Evaluation data demonstrate excellent equivalence between the c4000 and c16000 analyzers. An excellent correlation was seen in the method comparison between c4000 vs c16000.

**Reference**

1. FDA guidance document: "Guidance for Industry and FDA Staff Replacement Reagent and Instrument Family Policy", December 11, 2003.

262

**THE CHOICE OF THE SAME KIND OF TUBE FOR BIO- AND IMMUNO-CHEMISTRY TESTS IN EMERGENCY AND ROUTINE LABORATOIRES**

V. Marinelli<sup>1</sup>, N. Bettinardi<sup>1</sup>, L. Manenti<sup>1</sup>, H.

Ingrassano<sup>1</sup>, L. Xaiz<sup>1</sup>, L. Leoni<sup>1</sup>, E. Torresani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochemical Analysis Laboratory, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano, Italy

In our biochemistry laboratory, tests are performed on a platform at high automation (CoreLab, Roche), using serum (S) samples. Every day we process about 1500 tubes on routine equipment in 7 h, and 283 tubes on emergency equipment in 24h. To improve TAT, it is better to use Lithium Heparin (LH); one of the major problems concerns glucose determination (1).

**Aim.** To verify the stability of glucose concentration in our routine laboratory during a working day in S, S with gel separator (SG), LH and LH with gel separator (LHG) tubes, since the literature is in contrast about that.

**Method.** In 5 working days we calculated the glucose mean concentration from routine S samples (n=2697). Blood was collected from volunteers into Vacutest Kima tubes: S, SG, LH and LHG (two sample for each kind of tube). The first S and LH tubes were immediately centrifuged (10 min at 3000 g) and processed; the second ones stayed at room temperature for 3 h before to be centrifuged and processed. Recently, Kima advised us that LH and LHG tubes were changed (reduction of LH amount); we repeated the same experiment only using LH and LHG tubes.

**Results.** Unpaired t test showed no significant difference in glucose concentration in different time slots of the day. The reduction of glucose concentration in samples centrifuged and processed after 3 h versus basal samples was major in LH (-34%) and LHG (-26.4%) than in S (-15.6%) and SG (-14.6%). After reduction of LH amount, we found the following decreasing: LH = -20.8%, LHG = -20.6%.

**Discussion.** In S, the decrease glucose concentration is as expected from the literature; we did not observe any difference in glucose concentration among S and SG tubes; otherwise it was very marked both in LH and in LHG tubes; after reduction of LH amount, the decrease of glucose concentration is better but still unacceptable.

**Conclusion.** Since emergency laboratory immediately process samples, it can use LH for glucose determination; differently, routine laboratory works all day with samples collected, overall, in the morning. Thus, the possibility to use the same kind of tube in routine and emergency laboratories must foresee a centrifugation of all LHG samples within 1 h from their arrive

**Reference**

1. Boyanton BL et al. Clinical Chemistry 2002;48:2242-7.

263

### VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DELLO STRUMENTO OC-SENSOR DIANA PER LA DETERMINAZIONE DEL SANGUE OCCULTO FECALE E CONFRONTO CON IL METODO HEMOCCULT II SENSA

R. Brivio<sup>1</sup>, A. Arosio<sup>2</sup>, G. Bestetti<sup>1</sup>, M.L. Carati<sup>1</sup>, V.E. Minolfi<sup>1</sup>, V. Moioli<sup>1</sup>, S. Pescia<sup>1</sup>, G. De Vito<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. S. Gerardo, Monza (MI)

<sup>2</sup>Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, Università Milano Bicocca, Monza (MI)

<sup>3</sup>Dipartimento Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano Bicocca, Monza (MI)

Introduzione. Studi dimostrano che la ricerca del sangue occulto fecale (SOF) è efficace nel ridurre la mortalità per il cancro del colon retto (1).

Scopo. 1) Verificare le prestazioni analitiche dello strumento OC-Sensor Diana (Eiken Chem) utilizzato per la ricerca del SOF nello screening coloretale dell'ASL MI3; 2) Eseguire un confronto col test Hemocult II SENSA (Beckman Coulter).

Materiali e Metodi. L'imprecisione è stata valutata analizzando: (a) in doppio 80 campioni a diverse concentrazioni di emoglobina (Hb); (b) in replicato (n=7) 3 campioni con concentrazione di Hb vicini al cut-off di 100 ng/mL; (c) in doppio due livelli di controllo per 20 giorni, una sessione al giorno (CLSI EP5-A2); (d) in doppio 10 campioni per 4 giorni. Linearità e recupero sono stati calcolati mediante diluizioni seriali (n=7) di un pool ad alte concentrazioni di Hb e aggiunte di Hb a pool di feci. Il carry-over è stato valutato dosando 10 campioni con bassa Hb preceduti da uno con elevata Hb. Il confronto è stato effettuato analizzando 150 campioni raccolti negli specifici contenitori seguendo le istruzioni preanalitiche del metodo al guaiaco. Risultati. L'imprecisione intra-serie (CV) è risultata di: (a) 1.65% (0-951 ng/mL, media 147, mediana 89) per gli 80 campioni in doppio; (b) 1.1%, 1.4% e 1.9% (99, 101, 103 ng/mL) per i 3 campioni replicati. L'imprecisione totale (CV) è stata di: (c) 3.7% e 2.5% per i due livelli di controllo (156 e 648 ng/mL); (d) compresa tra 1.5% e 5.9% per i 10 campioni dosati per 4 giorni (32-216 ng/mL). Il metodo è lineare a 977 ng/mL, la retta di regressione ha dato pendenza=1.03 e intercetta=-14. Il recupero medio è stato del 102%. Non si è evidenziato carry-over. Lo studio di confronto ha mostrato che dei 150 campioni raccolti da 69 soggetti, 97 erano concordanti (64.7%) 53 discordanti (35.3%); 48 campioni sono risultati positivi solo ad Hemocult e 5 solo ad OC Sensor.

Conclusioni. Lo strumento OC Sensor Diana ha fornito prestazioni analitiche che lo rendono applicabile ad uno screening. Vanno ulteriormente verificate le discrepanze col test al guaiaco in parte attribuibili alle differenti caratteristiche dei metodi.

#### Bibliografia

1. Ministero della Salute – Screening Oncologici 2006; 55-77

264

### G6PDH E' AUTOMATIZZABILE? SI... ESPERIENZE E RISULTATI DAL PRELIEVO AL REFERTO

A. Cugini<sup>1</sup>, E. Marelli<sup>1</sup>, R. Sansottera<sup>1</sup>, L. De Angelis<sup>1</sup>, M. Valdambri<sup>1</sup>, F. Vespasiani<sup>1</sup>, D. Giavarina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sentinel CH. SpA, Milano

<sup>2</sup>Osp. S. Bortolo, Vicenza

Scopo. Fornire agli utilizzatori una procedura per ridurre la manualità operativa, evitare gli errori preanalitici dovuti al lavaggio delle emazie, eseguire procedure validate con risultati accurati e precisi.

Materiali/Strumenti. Reagente G6PDH fornito da Sentinel CH, analizzatori SIEMENS (ADVIA<sup>TM</sup>, DIMENSION®, VISTA<sup>TM</sup>), ROCHE (sistemi Hitachi), ABBOTT (Architect®/Aeroest®); ORTHO DIAGNOSTICS (Vitros<sup>TM</sup> 5.i), BECKMAN (Synchron LX<sup>TM</sup>), OLYMPUS, SENTINEL (Biolis 24i).

Studio/Design. Definire una procedura standardizzata per ridurre gli errori della fase preanalitica e verifica delle performance analitiche, con protocolli NCCLS, sui più comuni strumenti presenti nei laboratori di due procedure, in base alle caratteristiche degli strumenti, a) completamente automatica dal sangue in toto al risultato finale, b) semiautomatica (lisi manuale 1+ 5 con lisante e dosaggio automatico del lisato). In questo studio oltre a valutare sensibilità, precisione, linearità e confronto (strumenti, metodi di lisi e un metodo di riferimento) è stato verificato il range di riferimento.

Risultati. Considerando tutti gli strumenti i dati di performance ottenibili sono: LOQ <=50 IU/L, linearità >= 2800 IU/L, imprecisione (ripetibilità/totale) CV% min e max su 3 livelli, è compreso tra 0,8-5,0/1,7-6,6, molto inferiori a quanto pubblicato da RICOS nel 2008 "Desirable Specifications For Total Error, Imprecision, And Bias, Derived From Biologic Variation".

La stabilità dei reagenti a bordo, in scomparti refrigerati, è di almeno 30 giorni.

Confronto. L'esecuzione del test con due metodologie, lisi manuale e automatica, mostra una sovrapposibilità dei risultati tra strumenti e metodi (pendenza >0.95), errori costanti (intercetta tra 10-50 IU/L) non significativi e una R tra 0.80-0.99.

L'analisi retrospettiva dei risultati (IU/Hb) ottenuti in 2 anni in un laboratorio ospedaliero permette la definizione dei valori di riferimento sulla popolazione italiana.

Conclusioni. I dati confermano la possibilità di automatizzare il metodo con risultati estremamente performanti, di semplificare l'operatività e che la scelta del metodo (semi o automatico) è dipendente parzialmente dagli strumenti in uso ma molto più da scelte organizzative proprie di ogni laboratorio.

265

**DOSAGGIO AL FOSFOTUNGSTATO DI VALORI ELEVATI DI CISTINURIA**

G. Cangiano<sup>1</sup>, A. Latte<sup>1</sup>, M. Russo<sup>1</sup>, F. Forte<sup>1</sup>, E. Di Maina<sup>1</sup>, C.I. Pandelli<sup>1</sup>, M.M. D'Ambrosio<sup>1</sup>, M. Terribile<sup>2</sup>, M. D'Amora<sup>3</sup>, A. Risitano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Patologia Clinica, Osp. dei Pellegrini, ASL NA 1

<sup>2</sup>U.O. Nefrologia, Osp. dei Pellegrini, ASL NA 1

<sup>3</sup>Lab. Patologia Clinica, Osp. degli Incurabili, ASL NA 1

La formazione di calcoli di cistina è dovuta ad un difetto congenito del riassorbimento tubulare dell'amminoacido sopra citato e degli aminoacidi dibasici ornitina, lisina ed arginina. La nostra esperienza quadriennale maturata effettuando screening metabolici urinari e controlli terapeutici su urine provenienti dall'U.O. di Nefrologia del P.O. dei Pellegrini e dai reparti Pediatrici della Seconda Università di Napoli e dell'A.O. Santobono-Pausillipon di Napoli ha evidenziato la necessità di quantificare direttamente, senza ricorrere ad alcuna diluizione dei campioni, i dosaggi di cistinuria, spesso numerosi e con elevata concentrazione, rapportandoli infine alla concentrazione della creatinuria. Rispetto al metodo originale adattato sullo strumento AU 600 Olympus e lineare fino a 25 mg/dL, la variazione da noi proposta prevede l'utilizzo di una calibrazione multipunto (tipo 7AB-polygonale) da 0 a 60 mg/dL e di un reagente al fosfotungstato più diluito (assorbimento a 5 mg/dL equivalente a circa 0,030). La determinazione a 600 nm si serve di due distinte metodiche: una che dosa la totalità dei gruppi sulfidrici (150 µL di reag.1: 5 mL di t. acetato, 1,5 mL di solfito di sodio e 3,5 mL di acqua; 100 µL di reag.2: ac. fosfotungstico) e l'altra (bianco) che determina tutti i gruppi sulfidrici non derivanti dalla cistina (150 µL di reag.1: 5 mL di t. acetato, 1,5 mL di solfito, 2,5 mL di acqua ed 1 mL di cloruro mercurico; 100 µL reag.2: ac. fosfotungstico). Ambedue le metodiche utilizzano 40 µL di urina. La reazione a termine viene letta dopo 27 cicli macchina (circa 9'). La calibrazione del bianco è identica a quella ottenuta per il dosaggio di tutti i gruppi solfidrici. La concentrazione di cistina sarà automaticamente ottenuta per differenza di risultati tra le due metodiche. Nell'intervallo analitico 5 - 70 mg/dL di cistinuria si evidenzia un profilo di imprecisione con un CV <5%. Le prove di recupero hanno valori compresi tra 90,8 e 117,9% (recupero medio: 100,8%). Le prove di precisione nella / tra le serie, mostrano un CV <5%. Il metodo è lineare fino a 70 mg/dL ( $y = 1,0035 \cdot x - 0,1422$ ;  $r^2 = 0,9987$ ).

**Bibliografia**

Cangiano G, Latte A, Russo M, et al. Determinazione fotometrica della cistinuria. *Biochim Clin* 2007;31:4:267-71.

266

**ANALYTICAL PERFORMANCE OF TWO ELISA ASSAY VS IRMA IN THE DETERMINATION OF CIRCULATING CHROMOGRANIN A**

O. Ruzzenente<sup>1</sup>, G.L. Salvagno<sup>1</sup>, C. Gherardini<sup>1</sup>, M. Montagnana<sup>1</sup>, E. Danese<sup>1</sup>, M. Gelati<sup>1</sup>, G. Lippi<sup>1</sup>, G.C. Guidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Osp. Policlinico G.B. Rossi, Verona, Italy

**Background.** Chromogranin A (CgA) belongs to the granin family of acidic secretory proteins. Owing to its widespread distribution in neuroendocrine tissues, it is used as serum marker of neuroendocrine activity. Currently, two different methods for assaying CgA, immunoradiometric assay (IRMA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are used in routine practice.

**Aim.** The aim of this study was to compare the analytical performances of two new ELISA immunoassays, LDN CgA (Labor Diagnostic Nord) and CGA-CISBIO (CIS bio international) with the reference IRMA, CGA-RIACT (CIS bio international).

**Methods.** For each experiments, two serum aliquots were assayed simultaneously with the current reference IRMA assay and the novel ELISA CgA. The results provided by the two ELISA assay methods (n=32) were analyzed vs IRMA assay separately. **Results.** Measuring range of the LDN CgA ELISA assay ranged between 10 and 1500 ng/mL, has described by the polynomial curve  $y=334x^2+179x-133$ ;  $r=0.999$ ,  $p<0.001$ . CGA-ELISA CISBIO has also a measuring range comprised between 10 and 1200 ng/mL, as described by the plot  $y=567x^2+110x+16$ ;  $r=0.999$ ,  $p<0.001$ . The median values (2.5-97.5 percentiles) of the samples were: 69 ng/mL(35-473 ng/mL) for CGA-ELISA CISBIO and 98 ng/mL(30-461ng/mL) for IRMA. In the second experiment the values were: 99 ng/mL(31-2047 ng/mL) for LDN CgA ELISA and 72 ng/mL(22-1300 ng/mL) for IRMA. The nonparametric regression according to the method of Passing & Bablok and the relative Spearman's correlation coefficient showed excellent performance for CGA-ELISA CISBIO (CGA-ELISA CISBIO= 0.95 x IRMA+ 21.1;  $r= 0.99$ ,  $p<0.001$ ) and LDN CgA ELISA (LDN CgA ELISA = 0.65 x IRMA - 1.15;  $r= 0.97$ ,  $p<0.001$ ). The overall bias between assays (ELISA vs IRMA) as estimated by Bland-Altman plots analysis was more satisfactory for CGA-ELISA CISBIO (-11%) than LDN CgA (+57%).

**Conclusion.** We conclude that the analytical performance and the technical features of new CGA-ELISA CISBIO Elisa make it a suitable assay for the quantification of CgA. Conversely the huge bias observed with the LDN CgA assay highlights the existence of some problem of standardization that should be solved before introduction in clinical practice.

**Reference**

Nobels FR et al.*Eur J Clin Invest.* 1998;28:431-40.

267

**BECKMAN COULTER IPTH ASSAY EVALUATION**

L. Bassi<sup>1</sup>, S. Rizzardi<sup>1</sup>, G. Pinardi<sup>2</sup>, A. Ballabio<sup>3</sup>, M.G. Barbarini<sup>1</sup>, L. Comelini<sup>1</sup>, R. Lupi<sup>1</sup>, F. Acerbis<sup>1</sup>, P.C. Ferrero<sup>1</sup>, S. Testa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico cliniche e Microbiologia, Az. Osp. Istituti Ospitalieri di Cremona, Presidio Cremonese

<sup>2</sup>Lab. Analisi Chimico cliniche e Microbiologia, Az. Osp. Istituti Ospitalieri di Cremona, Presidio Oglio Po

<sup>3</sup>Serv. Lab. Analisi, Osp. di Castel San Giovanni (PC)

**Introduction.** Parathyroid hormone (PTH) is important for his biological role in calcium and phosphate blood concentration maintaining, but its determination is very critical. During the last decades, several 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation (gen) assays were proposed, all presenting different interferences due to fragments derived from the original 84 amino acids peptide. Aim of the study. Evaluate Access iPTH (A-PTH) assay on UniCelDxl800 Beckman Coulter in terms of analytical and functional sensitivity (AS, FS) and comparison with 3<sup>rd</sup> gen WholePTH (WS-PTH) and 2<sup>nd</sup> gen iPTH (iS-PTH) Scantibodies Inc. Methods. AS: 21 standard 0 replicates (3 decimals elaboration); FS: standard 10 and 60 pg/mL dilutions. Methods comparison on 143 samples (1 month collection) -80°C frozen for WS-PTH and A-PTH; on 114 of 143 iS-PTH.

**Results.** AS: 0,070 pg/mL (product insert, PI, claim <1pg/mL). FS: mean and CV respectively 1,004 – 13,190%; 2,074 – 5,212%; 2,123 – 5,123%; 2,834 – 4,932% (PI claim <4pg/mL).

**Assays results**

A-PTH: mean = 237,064±242,325; median = 177,400.

WS-PTH: mean = 130,000±135,059; median = 78,000.

iS-PTH: mean = 298,649±284,848; median = 208,500.

**Methods comparison**

A-PTH versus WS-PTH:  $r=0,9462$  ( $P<0,0001$ ), Passing&Bablok regression  $y= 0,5310x - 0,4956$  ( $P<0,01$ ).

A-PTH versus iS-PTH:  $r=0,9816$  ( $P<0,0001$ ), Passing&Bablok regression  $y= 1,1111 x - 9,7222$  ( $P<0,01$ ).

iS-PTH versus WS-PTH:  $r=0,9521$  ( $P<0,0001$ ), Passing&Bablok regression  $y= 0,5015x + 0,4355$  ( $P>0,05$ ).

**Conclusion.** AS is largely lower than PI claim. FS is actually <1pg/mL, but we are running also some PTH low concentration plasma pool. As expected, the 2<sup>nd</sup> gen resulted overestimated compared with 3<sup>rd</sup> gen assays. Cross comparison gives good correlation, but there is a significant difference ( $P<0,01$ ) between 2 Scantibodies and A-PTH, whereas there is no differences between WS-PTH and iS-PTH, probably due to antibodies configuration. These results outline again International Standard need for PTH assay.

**Reference**

D'Amour P, Brossard JH, Rakel A, et al. Cantor "Evidence That the Amino-Terminal Composition of Non-(1–84) Parathyroid Hormone Fragments Starts before Position 19". Clin Chem 2005;51(1)169-16.

268

**CONFRONTO FRA METODI NELLA DETERMINAZIONE DELL'EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c) IN CAMPIONI CON PRESENZA DI VARIANTI EMOGLOBINICHE**

A. Liverani<sup>1</sup>, C. Artusi<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

**Introduzione.** L'HbA1c è la frazione emoglobinica che presenta glucosio legato alle estremità delle catene  $\beta$  globiniche. I sistemi analitici attualmente utilizzati si possono suddividere in: 1) metodi basati sulla differenza di carica elettrica; 2) cromatografia di affinità; 3) metodi immunochimici. L'HPLC rappresenta la tecnica di elezione per maggiore sensibilità, precisione, accuratezza e specificità; tuttavia la presenza di varianti emoglobiniche può determinare interferenze analitiche qualora non sia possibile una adeguata separazione cromatografica tra le varie frazioni. **Obiettivi.** Valutare gli effetti della presenza di varianti emoglobiniche nella determinazione dell'HbA1c, confrontando due sistemi diagnostici che utilizzano principi analitici differenti.

**Materiali e Metodi.** Sono stati raccolti campioni di sangue intero (n=80) di pazienti afferenti al nostro Laboratorio con richiesta di HbA1c, alcuni (n=50) privi di varianti emoglobiniche e altri (n=30) che presentavano alcune delle varianti più comuni (HbS, HbC, HbD Punjab, HbE e HbO-Pd). Tutti i campioni sono stati analizzati con metodo HPLC (Adams HA8160 TP, Menarini Diagnostics) e con metodo immunometrico (HbA1c TQ Gen.2; Cobas 6000, Roche Diagnostics).

**Risultati.** Il confronto tra metodi effettuato attraverso l'analisi della regressione lineare e di Bland-Altman, in campioni privi di varianti emoglobiniche evidenzia una buona correlazione:  $R^2=0.96$ ; bias=-0.03(CI 95% -0.53/0.47). Nei campioni di pazienti con varianti emoglobiniche il bias risulta maggiore, 0.57(CI 95% -0.30/1.45), pur rimanendo statisticamente non significativo. Tuttavia, dal punto di vista clinico, in base alle raccomandazioni dell'American Diabetes Association, al livello decisionale del 6% la differenza tra i metodi risulta significativa (>0.6%).

**Conclusioni.** La presenza di varianti emoglobiniche può comportare errori nel calcolo della percentuale di HbA1c in relazione alle prestazioni del sistema analitico utilizzato. L'interpretazione dei risultati in caso di emoglobinopatie necessita quindi di particolare attenzione e soprattutto di una scelta adeguata del metodo da utilizzare in base alle raccomandazioni fornite dagli organismi di standardizzazione.

269

**DOSAGGIO DELLA FOSFATASI ALCALINA OSSEA (BAP) NEI PAZIENTI EMODIALIZZATI: CONFRONTO TRA METODI**

P. Tozzi<sup>1</sup>, F. Pirolo<sup>1</sup>, A. Neri<sup>1</sup>, F. Balboni<sup>2</sup>, A. Salati<sup>2</sup>, N. Della Malva<sup>2</sup>, M. Gallo<sup>3</sup>, D. Sacchi<sup>3</sup>, G. Monzani<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. Generale Dip. Diagnostica di Lab. Az. Osp. Univ. CAREGGI, Firenze

<sup>2</sup>Lab. Analisi, IFCA, Firenze

<sup>3</sup>Centro Dialisi Ulivella, IFCA, Firenze

L'isoforma ossea della Fosfatasi Alcalina (BAP) presente nel siero deriva esclusivamente dalla attività osteoblastica; viene pertanto considerata un marcatore biochimico specifico di formazione ossea, per cui la sua concentrazione riflette, in buona approssimazione, lo stato metabolico degli osteoblasti. Il dosaggio della BAP è quindi utile nelle condizioni patologiche riguardanti il metabolismo del calcio e nelle patologie con elevato turnover osseo.

In particolare nell'iperparatiroidismo secondario e nell'osteodistrofia renale (che caratterizza gran parte dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica) la BAP fornisce un utile supporto informativo nel monitoraggio della terapia con farmaci che tendono a controllare l'asse Calcio-Fosforo-Paratormone.

Scopo del lavoro è stato confrontare tre diverse metodiche per il dosaggio della BAP.

58 campioni di siero da pazienti Emodializzati e 17 da pazienti Non Dializzati sono stati analizzati con i metodi CLIA (BAP OSTASE® LIAISON® DiaSorin SpA, standardizzato verso il kit Access OSTASE® della ditta Beckman), ELISA (Osteia™ OSTASE® BAP IDS Ltd) ed elettroforetico (Hydragel 15 ISO-PAL Sebia).

La correlazione lineare di Pearson evidenzia un buon accordo fra le due metodiche BAP OSTASE DiaSorin e IDS ( $y = +0,81 x - 2,16$   $R=0,97$  per i pazienti Emodializzati;  $y = +1,07 x - 2,82$   $R=0,92$  per i pazienti Non Dializzati).

L'analisi di Bland-Altman evidenzia una differenza media fra ELISA e CLIA di 6,5 µg/L per i pazienti Emodializzati e di 1,1 µg/L per i Non Dializzati. Non è stato possibile eseguire la correlazione fra le due metodiche immunometriche e quella elettroforetica perché il kit Sebia esprime il risultato come valore percentuale (%) della ALP 'totale' (espressa in UI/L) mentre gli altri kit esprimono i valori in µg/L.

Per questo motivo abbiamo ritenuto corretto verificare la concordanza dei risultati espressi per i pazienti Emodializzati, in particolare fra le metodiche DiaSorin e Sebia: tale concordanza è risultata essere del 93%.

Le tre metodiche sono ben correlate e forniscono risultati analoghi.

Reference

Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease – K/DOQI 2003.

270

**IMMULITE® 2000 ANALYSER VS RADIO-IMMUNOASSAY IN ANDROSTENEDIONE MEASUREMENT**

A. Pracucci<sup>1</sup>, A. Pasini<sup>2</sup>, A. Piscopo<sup>1</sup>, N. Contadini<sup>1</sup>, S. Vallicelli<sup>1</sup>, S. Bellini<sup>1</sup>, R. Asirelli<sup>1</sup>, P. Iorio<sup>1</sup>, R. Dorizzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Unico Centro Servizi Area Vasta Romagna, Sezione R&D, Pievesestina (FC)

<sup>2</sup>Lab. of Cellular and Molecular Engineering, University of Bologna, Campus of Cesena (FC)

Aim. Androstenedione (A4), a major precursor for both testosterone and estrone, represents an useful marker for women hirsutism and virilization and has been measured since 1980 using radioimmunoassays (RIAs). The aim of this study was to compare a recently marketed automated chemiluminescence assay to the commercial radioimmunoassay used in our laboratory.

Materials and Methods. A4 has been measured using a commercial RIA ( $\Delta 4$ -Androstenedione CT, RADIM, Pomezia, Italy) and the chemiluminescence assay Immulite® 2000 (DPC-Siemens Healthcare, Milan, Italy) based on a rabbit anti-A4 polyclonal antibody on solid phase, in 52 samples (concentration: 0.1 - 10.4 ng/ml) selected in the routine workload. Alkaline phosphatase-labeled A4 is coincubated with sample for 60 minutes and enzyme activity is determined with a chemiluminescent substrate. Data analysis has been performed with Analyse-it® software. Results. Immulite® 2000 and RIA results were respectively (concentration ng/ml): mean 2.34, 2.50; median 2.21, 2.30; 25<sup>th</sup> percentile 1.31, 1.44; 75<sup>th</sup> percentile 2.96, 3.33. Comparison between Immulite and RIA measurements using Passing and Bablok regression equation resulted in:  $\text{Immulite2000} = 0.97$  (Confidence Interval (CI): 0.87 to 1.08)  $\times$   $\text{RIA} - 0.13$  (95% CI: - 0.37 to 0.05); correlation was  $r = 0.91$  (95% CI: 0.85 to 0.95). The Bland Altman plot demonstrates constant lower A4 concentration (mean 7.2%) of Immulite® 2000 results compared to RIA.

Conclusions. Data show that Immulite® 2000 results are substantially equivalent to those yielded by RIA with all the advantages of an automated analyzer, safer for the operator and not requiring isotopes usage.

271

**NEW CHEMILUMINESCENT SEX-HORMON BINDING GLOBULIN (SHBG) IMMUNOASSAY EVALUATION**

E. Pazzaglia<sup>1</sup>, C. Di Pietro<sup>1</sup>, G. Bianchi<sup>1</sup>, P. Mezzolani<sup>1</sup>, O. Stocchi<sup>1</sup>, D. Vandini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Analysis Operative Urbino Hospital

**Background.** SHBG is a transport glycoprotein synthesized by the liver with high binding affinity for 17-hydroxysteroid hormones, as testosterone (T) and estradiol. Calculating the Free T Index (FTI) or the Free Androgen Index (FAI) requires the measurement of total T and SHBG. Equation: FAI (%) = (TT/SHBG)\*100. The FAI is considered useful in estimating free T in women with hirsutism or hyperandrogenism.

**Aim of the study.** Evaluate practicability and reliability of Beckman Coulter Access SHBG (A-SHBG) on UniCel DxI800 and comparison with our routine method Siemens SHBG on Immulite 2000 (I-SHBG).

**Methods.** Serum samples are obtained from 81 subjects (62 M, 21F) and assayed with both A-SHBG and I-SHBG chemiluminescent immunossays. Results are analysed with Band&Altman plot (BA), Passing& Bablock regression (PB) and Correlation coefficient (r) with MedCalc software. Accuracy and precision were evaluated with 2 levels Beckman QC (L1 10nmol/L, L2 100nmol/L) during 21 routine days. Practicability was evaluated in terms of speed and consistency with laboratory organization (Power Processor pre-analytical system with biochemistry and immunoassay integrated analysers).

**Results.** BA % differences: arithmetic mean=-16.957, SD=15.4925, lower limit=-47.2811, upper limit=13.4497.

PB:  $y=-2.4255+1.2789x$ ; intercept 95% interval confidence (95%IC)=-5.1846 to 0.1947; slope 95%IC=1.1930 to 1.3846; negative cusum test for linearity.

$r=0.9514$ ;  $P<0.001$ ; 95%IC=0.9253 to 0.9686.

QCL1: intra-assay: mean 9.60, CV%= 8.53, DS=0.8, bias=4.3; inter-assay CV%=7.58, DS = 0.73, bias=3.9

CQL2: intra-assay: mean 97, CV%= 8.56, un DS=8.3, bias=3; inter-assay CV%=7.37, DS = 7.19, bias=2.3

**Practicability:** speed 30 min first result, throughput 200 tests/hour, calibration stability 28 days.

**Conclusions.** A-SHBG is an analytical very reliable test, and should be an advantage to include it in our laboratory automation line, using one tube per patient and reporting this test in continuum, saving human resources costs and time. Including SHBG test in endocrinology routine confirms laboratory role in clinical endocrinology management.

**Reference**

Morimoto I et al. Free testosterone index: comparison with plasma free testosterone. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi 1986; 62:797-806.

272

**VALIDAZIONE PRELIMINARE DEL METODO ENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'AMMONIO URINARIO**

I. Maccabruni<sup>1</sup>, F. Cappellini<sup>1</sup>, R. Falbo<sup>1</sup>, P. Mocarelli<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio. Ospedale di Desio, Desio, MB

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale (DIMS), Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi Milano Bicocca, MB

**Introduzione e scopo del lavoro.** Le determinazioni dell'ammonio sierico vengono effettuate su strumentazione automatizzata mediante il metodo enzimatico che sfrutta la reazione catalizzata dalla glutammato deidrogenasi. In letteratura viene proposto l'utilizzo della stessa reazione anche per il dosaggio dell'ammonio su campioni di urina. Scopo del lavoro è stato quello di validare l'efficacia di tale metodo nel misurare accuratamente l'ammonio urinario.

**Materiali e Metodi.** Il metodo è stato validato su strumentazione "Cobas Integra 400 Plus" di Roche Diagnostics presso il Laboratorio analisi del Presidio ospedaliero di Desio. Come riferimento per la validazione preliminare del metodo è stato utilizzato il documento CLSI EP-10-A3. Sono state utilizzate urine fresche di pazienti diluite con acqua bi-distillata per ottenere 2 differenti livelli (LIV1, LIV2) di concentrazione quantificabili dallo strumento. I parametri valutati sono stati: precisione (ripetibilità, riproducibilità), accuratezza (recupero), linearità. Ripetibilità: 10 misurazioni sui campioni LIV1 e LIV2. Riproducibilità: 3 determinazioni per 5 giorni per ciascun livello. Recupero: per ciascuno dei livelli è stata aggiunta una quantità nota di cloruro d'ammonio (NH<sub>3</sub>Cl). Linearità: un campione di urina con concentrazione di NH<sub>3</sub> pari a 9.68 mg/mL è stato utilizzato come punto di partenza per ottenere dei campioni che a parità di volume contenessero concentrazioni di analita decrescenti.

**Risultati.** Per ciascuno dei 2 livelli i risultati ottenuti sono stati: per la ripetibilità, CV% = 1,07 e 1.63; per la riproducibilità, CV% = 1.05 e 1.05; per i recuperi percentuali con NH<sub>3</sub>Cl, 99.62 e 99.51; infine per la linearità, R<sup>2</sup>=0,99.

**Conclusioni.** Il metodo valutato si è rivelato essere preciso, accurato e lineare. E' stato inoltre possibile confermare che la conservazione delle urine a 4°C fino ad un mese non determina cambiamenti nella [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>].

**Bibliografia**

Katagawa K, et al. Kidney Int. 1989;36:291-4.

273

**VALUTAZIONE DELL'ANALIZZATORE TOSOH G8**E. Cavalcanti<sup>1</sup>, M. Cilento<sup>1</sup>, B. Dente<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Osp. San Paolo, ASL Napoli 1 centro

Abbiamo valutato l'analizzatore HLC-723G8(Tosoh) per la rilevazione della HbA1C, secondo il protocollo raccomandato dalla ECCLS(1). Per il calcolo dell'imprecisione nella serie è stato analizzato un set di controlli HbA1C a due livelli (Tosoh, cod. 019405-F) ricostituiti secondo le indicazioni del produttore e divisi in aliquote conservate a -20°C fino all'uso, nonché due campioni di sangue da paziente, con aggiunta di EDTA, uno a livello alto (9.7%) e l'altro normale (5.0%) di HbA1C ripetendo le serie per 20 volte in tre giorni consecutivi. I CV ottenuti erano sempre al di sotto dell'1%. (Lev.1= 0.54%, Lev 2= 0.30%, Campione P= 0.39%, Campione N= 0.95%).

L'imprecisione tra le serie è stata valutata come CV% ottenuti analizzando i due campioni di controllo in duplicato per 15 giorni. Anche in questo caso i CV non superavano l'1% (Lev.1= 0.78 %, Lev.2= 0.60%).

È stato anche valutato l'effetto della sedimentazione e della conservazione dei campioni di sangue selezionando tre campioni da paziente a diversi livelli di HbA1C (4,8%, 7,1%, 14,5%). Questi sono stati analizzati subito dopo il prelievo e dopo conservazione a 4°C ogni tre giorni per 15 giorni, sia prima che dopo miscelazione. I risultati ottenuti dimostrano che non vi è stato alcun effetto sulla misura dell'HbA1C.

Per valutare l'eventuale interferenza da elevati livelli di HbF sono stati analizzati campioni di sangue di neonati ricoverati presso il nostro Ospedale a diverso livello di HbF. I risultati ottenuti dimostrano che il dosaggio dell'HbA1C è consentito anche con livelli di HbF del 10%.

Dopo incubazione di due campioni di sangue con glucosio (fino a 50 mmol/l) per due ore a 37°C non si sono avuti incrementi nel valore della HbA1C mentre la frazione labile aumentava da due a tre volte il valore di base. Ciò dimostra che il metodo è specifico per la frazione HbA1C stabile.

I risultati ottenuti mostrano una ottima affidabilità del sistema Tosoh G8 che, anche per le sue caratteristiche di velocità e semplicità operativa, lo rendono idoneo al dosaggio dell'HbA1C nei Laboratori di Biochimica Clinica.

**Bibliografia**

1. E.C.C.L.S. Guidelines for the evaluation of analyzers in clinical Chemistry, 3rd . Draft. Berlin: Beuth verlag GmbH, ECCLS document. Vol.3, n.2, 1986.

274

**VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DI UN NUOVO METODO DI DOSAGGIO DELLA TROPONINA I APPLICATO ALL'ANALIZZATORE AQT90 FLEX**E. Novello<sup>1</sup>, M.M. Mion<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova

**Introduzione.** Negli ultimi anni si è assistito, nell'ambito della diagnostica cardiologica, ad un enorme sviluppo della tecnologia point-of-care (POC) dovuto sia all'esigenza di garantire tempi di risposta sempre più ridotti (come da raccomandazioni ESC/ACC), sia alle difficoltà di Servizi di Medicina di Laboratorio Decentrati di assicurare le tempistiche raccomandate. Scopo del lavoro è stato quello di valutare un nuovo metodo di dosaggio della troponina cardiaca I (cTnI) sull'analizzatore POC AQT90 FLEX (Radiometer Medical ApS, Denmark).

**Metodi.** Il metodo in valutazione consiste di un immunodosaggio-sandwich con rilevazione fluorimetrica a risoluzione temporale. Tutti i valori di cTnI sono espressi in µg/L.

**Risultati.** Per lo studio dell'imprecisione intra e inter-serie (CLSI EP5-A) sono stati dosati rispettivamente 9 pools di plasma K2EDTA (n=10 per ciascun pool) e 9 pools di plasma K2EDTA (n=80 per ogni pool). Range concentrazioni, CV: Intra-serie= 0.022-0.046, 5.75-10.99%; Inter-serie= 0.017-0.084, 4.80-13.72%; 10%CV= 0.023. Per lo studio della concordanza tra metodi sono stati utilizzati i campioni di 108 pazienti analizzati su AQT90 FLEX (sangue K2EDTA; range di concentrazione cTnI: <0.010-25.00) e su Dimension RxL (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) (plasma litio-eparina). Le concentrazioni di cTnI misurate su AQT90 FLEX sono state calcolate inserendo il valore dell'ematocrito del paziente (range: 22.60-48.70%). Cut-off applicati: 0.023 (AQT90 FLEX), 0.15 (Dimension RxL). Concordanza osservata: 98%; Regressione lineare: AQT90 FLEX= 0.2057 x Dimension RxL + 0.0025 (r=0.99). Per AQT90 FLEX sono stati confrontati i valori di cTnI calcolati utilizzando l'ematocrito standard (42%) e l'ematocrito misurato, che non hanno evidenziato differenze nella classificazione dei pazienti.

**Conclusioni.** L'analizzatore POC AQT90 FLEX per il dosaggio della cTnI si è dimostrato di facile utilizzo, sicuro e rapido (primo risultato dopo 18 minuti, con accesso continuo dei campioni). Le prestazioni analitiche si sono dimostrate soddisfacenti ed adatte all'implementazione in strutture di medicina d'urgenza o nelle unità coronariche.

275

**VALUTAZIONE DI ELECSYS® sFLT-1 E ELECSYS® PIGF PER LA DIAGNOSI DI PREECLAMPSIA**

A.S. Tirelli<sup>1</sup>, E. Arnaboldi<sup>1</sup>, I. Felicetta<sup>1</sup>, A. Di Modugno<sup>1</sup>, F. Napolitano<sup>1</sup>, C. Giavardi<sup>1</sup>, E. Torresani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fond. Policlinico Osp. Maggiore, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

La preeclampsia è una severa complicazione durante la gravidanza che colpisce circa il 5% delle gestanti ed è una delle principali cause di morte della donna, del feto o del neonato per parto prematuro. Essa è caratterizzata dall'insorgenza di ipertensione, gonfiore e proteinuria dopo la 20a settimana di gestazione. Sebbene il meccanismo patogenetico della preeclampsia non sia completamente chiarito, sembra che alterazioni di fattori angiogenetici della placenta abbiano un ruolo centrale e quindi la letteratura sottolinea l'importanza di dosare sFlt-1 (soluble Fms-like tyrosine kinase o recettore solubile di VEGF) e PIGF (Placental Growth Factor) nel siero di donne gravide. Scopo del nostro studio è stato valutare le caratteristiche tecniche di nuovi reagenti (Elecsys® sFlt-1 e Elecsys® PIGF) forniti dalla ditta Roche (Germania) in condizioni di routine su strumentazione automatica (Modular E) e paragonare i risultati ottenuti per entrambe i parametri con il metodo di riferimento in micropiastra (Quantikine, R&D Systems). I risultati presentati sono parte di un lavoro multicentrico condotto a livello europeo. Le variabilità intraserie (n= 21) e tra serie (n= 12) sono state determinate in 4 campioni controllo e in 5 pool di sieri umani a diverse concentrazioni. Sono stati raccolti 80 sieri (53 donne gravide a diverse settimane di gestazione, 19 non gravide e 8 uomini) per la determinazione dei livelli e 67 sieri sono stati utilizzati per la correlazione tra metodi di entrambi i tests.

Per sFlt-1 l'imprecisione entro la serie era compresa tra 0.6 -1.5 % CV per valori da 40 a > 60.000 pg/ml e tra serie 0.9 - 4% CV. Per PIGF la variabilità entro la serie era tra 0.6-5.8 % per valori da 5 a > 8.000 pg/ml e tra serie 0.8 - 4.5 %. La comparazione tra i lotti era eccellente. I valori di sFlt-1 in donne con gravidanza normale variano da 67 a 1569 pg/ml rispetto alle non gravide  $75 \pm 9.8$  e i valori di PIGF variano da 12 a 796 pg/ml rispetto a  $16.3 \pm 2.9$ . Abbiamo ottenuto una buona correlazione tra i due metodi di dosaggio per entrambi gli analiti ( $r > 0.93$ ). In conclusione i nuovi tests automatici di sFlt-1 e PIGF sembrano essere riproducibili ed applicabili in un sistema di routine per una diagnosi di preeclampsia.

276

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TOXOPLASMA GONDII IN PREGNANT WOMEN IN EMILIA ROMAGNA**

S. Pignanelli<sup>1</sup>, F. Delucca<sup>1</sup>, F. Savegnago<sup>1</sup>, A. Shurdi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Hematology and Oncological Sciences L. & A. Seràgnoli, Section of Microbiology, University of Bologna, Bologna, Italy

T. gondii (Tg) infection, common parasitic zoonosis, is an important cause of various clinical diseases and death worldwide. The prevalence of this parasite, in humans, is between 15-85% in the world, depending on age and geographical location. The goal in this study is the evaluation, with a direct technique, the Tg DNA prevalence in pregnant women between in 2007-2008.

In 40 amniotic fluids (AF) from Gynecology-Obstetrics Dpt., were investigated with LightCycler Real-Time PCR Tg LCSet. The clinical specimens (CSs) have been extracted, using automated system, NucliSens easyMag Biomerieux. A genomic fragment of the parasite (Tg repetitive DNA sequence) was amplified. The LOD of this kit is 10 copies/PCR reaction in CSs. The amplicon was detected by fluorescence using a specific pair of Hybridization Probes labelled with LightCycler-Red-640 (FRET molecular technique). In 2007-2008 the prevalence of DNA of Tg in AF is 10% (4/40). The CSs were coming in laboratory from Gynecology-Obstetric Dpt. of various Hospitals of the Emilia Romagna (Bologna 72.5%, Ferrara 12.5%, Faenza 5%, Modena 5%, Ravenna 2.5%, Imola 2.5%) by pregnant women in 8-12 gestational weeks and with border-line or positive serological techniques. The pregnant women were 26-39 years old.

There are many difficulties in toxoplasmic diagnosis. Today the major diagnostic techniques for Tg are serological techniques, but with many limitations (1). Therefore a more efficient method is needed to provide a rapid detection of this pathogen, to support the serological techniques. Several PCR-based techniques have been developed for the Tg diagnosis, using various clinical specimens. The prevalence of Tg, in this study, was lower in comparison with the data of other studies. In conclusion, the RT-PCR for detection the Tg DNA appears an easy, accurate and rapid diagnostic technique for the diagnosis of acute infection by Tg, with compliant results with serological test. Unfortunately the high costs and absence of kit certified CE-IVD limit the use of these techniques for clinical diagnosis.

Reference

1. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, et al. Real-Time PCR for Quantitative Detection of Toxoplasma gondii. J Clin Microbiol 2000;38(11):4121-5.

277

**NUOVO METODO IMMUNOFLUORIMETRICO PER LA MISURA DELLA CISTATINA C: PRESTAZIONI ANALITICHE E APPLICAZIONI CLINICHE**N. Vajente<sup>1</sup>, M. Zaninotto<sup>1</sup>, M. Plebani<sup>1</sup><sup>1</sup>Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

Introduzione. La Cistatina C (CysC), prodotta dalle cellule nucleate e presente nei liquidi biologici, per il basso peso molecolare (13kDa) è liberamente filtrata dai glomeruli, e riassorbita dai tubuli renali. Non essendo influenzata da fattori quali età, sesso, dieta, massa muscolare o stati infiammatori, appare un buon candidato nella valutazione della funzionalità renale.

Materiali e Metodi. Nel metodo immunofluorimetrico valutato (Cystatine C, TOSOH, Italia; AIA-1800) le tipiche test-cups contengono un anticorpo monoclonale adeso a biglie magnetiche che lega la CysC del campione, riconosciuta da un secondo anticorpo legato a fosfatasi alcalina agente sul 4-metilumbelliferil fosfato. Le prestazioni analitiche valutate sono: imprecisione (2 livelli di controllo; 3 pools siero; n=20); linearità (3 campioni siero, 6 diluizioni da 1:1 a 1:64); sensibilità analitica (Calibratore 0, n=20; media+3 DS); effetto matrice (siero vs litio-eparina; siero vs EDTA; n=55). Il metodo in studio è stato confrontato col metodo nefelometrico più diffuso nella pratica routinaria (Cistatina C, BNII, Siemens), su pazienti con patologia renale (n=105) e su campioni di donatori sani (n=133).

Risultati. Imprecisione nella serie: controlli media 0.04 e 0.16 mg/L, CV% 1.9 e 3.5; pools media 0.81, 2.24, 6.58 mg/L, CV% 2.9, 2.3, 3.1; tra le serie: controlli media 0.04 e 0.16 mg/L, CV% 5.7 e 5.0; pools media 0.89, 2.39, 6.98 mg/L, CV% 7.1, 4.3, 4.2. Studio di linearità: concentrazioni: 8.68, 13.05, 10.30 mg/L, percentuali di recupero: 100÷120%, 100÷110%, 100÷150%. Sensibilità analitica misurata: 0.00017 mg/L. Effetto matrice: buona correlazione siero vs plasma litio-eparina, differenza significativa siero vs plasma EDTA (Wilcoxon test: p=0.0653; p=0.0011 rispettivamente). Correlazione col metodo di confronto (n=238): pendenza=1.044, intercetta=0.1562, R=0.99; BIAS positivo (0.17) significativo solo nei campioni di donatori sani (pendenza=1.215, intercetta=0.0255, R=0.94).

Conclusioni. La disponibilità di nuovi metodi automatizzati applicati a piattaforme analitiche ampiamente diffuse e caratterizzati da ottime prestazioni analitiche, come evidenziato nello studio, consentirà di diffondere l'utilizzo della Cistatina C, un marcatore biochimico finora scarsamente valutato.

278

**NUOVO SISTEMA ANALITICO OLYMPUS AU680: VALUTAZIONE DELL'IMPRECISIONE ANALITICA CON RIFERIMENTO AGLI OBIETTIVI DERIVATI DALLA VARIABILITÀ BIOLOGICA**G. Cattozzo<sup>1</sup>, C. Albeni<sup>1</sup>, A. Calonaci<sup>1</sup>, G. De Luca<sup>1</sup><sup>1</sup>Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

Il nuovo sistema analitico AU680, proposto da Olympus come evoluzione del sistema AU640, si caratterizza per l'utilizzo di volumi ridotti di campione e reagenti, per la possibilità di eseguire analisi con metodi che impiegano fino a tre reagenti e per la possibilità di ripetere analisi in tempo reale. Scopo di questo lavoro è la verifica delle caratteristiche di imprecisione analitica di tale sistema, con riferimento agli specifici obiettivi derivati dalla variabilità biologica. Le componenti dell'imprecisione (nella-serie e tra-serie) sono state valutate a due livelli di concentrazione (per la proteina C-reattiva, tre livelli), analizzando cinque replicati in ciascuna di cinque serie analitiche, eseguite in giorni differenti, ed applicando ai risultati ottenuti l'analisi della varianza. Per ciascun metodo analitico, l'imprecisione totale osservata è stata confrontata con gli obiettivi di imprecisione analitica ottimali, desiderabili e minimi, calcolati moltiplicando il pertinente livello di variabilità biologica intra-individuale per un coefficiente pari a 0,25, 0,50 e 0,75, rispettivamente. Gli obiettivi ottimali di imprecisione sono stati rispettati per alanina amminotransferasi,  $\alpha$ -amilasi, aspartato amminotransferasi, bilirubina, calcio, colesterolo, creatina chinasi, ferritina,  $\gamma$ -glutammina transferasi, glucosio, HDL-colesterolo, lattato deidrogenasi, lipasi, potassio, proteina C-reattiva (anche per concentrazione prossima a 1 mg/L), transferrina, trigliceridi, urato ed urea. Per albumina, cloruro, fosfatasi alcalina e proteine totali si sono osservati livelli di imprecisione talvolta superiori ai livelli ottimali, pur rispettando i pertinenti obiettivi di imprecisione desiderabili. Per quanto riguarda la creatinina, il metodo enzimatico ha mostrato livelli di imprecisione ottimali, mentre per il metodo basato sulla reazione con picrato si è osservata imprecisione più elevata, ma comunque inferiore all'obiettivo desiderabile. Per il sodio si è riscontrata imprecisione pari all'obiettivo desiderabile (0,4 %) alla concentrazione di 150 mmol/L, mentre alla concentrazione di 119 mmol/L l'imprecisione è risultata superiore all'obiettivo minimo (0,57 % vs 0,52 %), ma comunque ai migliori livelli dello stato dell'arte.

279

**VALUTAZIONE DEL CITOFUORIMETRO SYSMEX UF-1000i NELLO STUDIO DEL LIQUIDO ASCITICO**

M.G. Alessio<sup>1</sup>, S. Buoro<sup>1</sup>, P. Dominoni<sup>1</sup>, R. Gustinetti<sup>1</sup>, P. Filisetti<sup>1</sup>, G. Merlo<sup>1</sup>, C. Gavazzeni<sup>1</sup>, M.G. Lucà<sup>2</sup>, S. Faggiuoli<sup>1</sup>, C. Ottomano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. Ospedali Riuniti, Bergamo

<sup>2</sup>U.O. Gastroenterologia, A.O. Ospedali Riuniti, Bergamo

**Obiettivo.** La citometria del Liquido Ascitico (LA) è di grande importanza nella diagnosi delle peritoniti batteriche. L'analisi in automazione è complicata dalla presenza di Macrofagi (MCR) e cellule Mesoteliali (MES) normalmente assenti nei liquidi di elezione dei sistemi automatici (sangue, urina). Sysmex UF-1000 differenzia su urina nativa le cellule nucleate in Leucociti (WBC) Cellule Epiteliali (EC) e Cellule Transizionali (SRC). Scopo del lavoro è stato di valutare le sue prestazioni rispetto a microscopio ottico (MO) nel conteggio di Leucociti (WBC) e Totale Cellule Nucleate (TNC) su campioni di LA.

**Materiali e Metodi.** 87 campioni consecutivi di LA raccolti in EDTA (76 da paracentesi, 11 da drenaggio) con cellularità da 61 a 3406 TNC/ $\mu$ L, mediana 282/ $\mu$ L, sono stati analizzati senza pretrattamento su UF-1000. Il conteggio di WBC e TNC è stato confrontato con metodo di riferimento a MO: conteggio TNC in camera di Nageotte e classificazione morfologica su vetrino citocentrifugato. Per UF-1000 il conteggio TNC è stato ottenuto sommando WBC, EC e SRC. La concordanza tra i metodi è stata valutata con correlazione Pearson (coefficiente r), retta di regressione Passing-Bablok, analisi Bland-Altman del Bias, correlazione Spearman.

**Risultati.** Si evidenzia ottima correlazione per il conteggio TNC ( $r=0.99$ ;  $y=0.93x - 3.71$ ) con Bias di -38.6 (IC95% da -52.2 a -18.2). Anche il conteggio WBC è ben correlato ( $r=0.99$ ;  $y=0.97x + 10.34$ ) con Bias migliore rispetto al TNC: +3.7, IC95% da -14.7 a +22.0. La presenza di MCR e MES è correlata in modo diretto e significativo ( $r$  di Spearman=0.71;  $p<0.0001$ ) alla percentuale di EC+SRC. **Conclusioni.** La concordanza dei conteggi TNC e WBC osservata dimostra il possibile impiego di UF-1000 per il conteggio cellulare di LA e un valido supporto all'analisi morfologica. I citogrammi di UF-1000 consentono infatti di valutare la presenza di Linfociti e soprattutto di Neutrofili, fondamentali per la diagnosi e il monitoraggio delle Peritoniti Batteriche. Al riguardo il conteggio Batteri di UF-1000, già validato per lo screening delle infezioni urinarie, può essere un ulteriore interessante applicazione da valutare in questo settore.

**Bibliografia**

Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approv. Guideline, CLSI H56-A Vol.26 No.26

280

**VALUTAZIONE DEL SISTEMA EMATOLOGICO SYSMEX XE-2100 NELLO STUDIO DEI LIQUIDI CAVITARI**

S. Buoro<sup>1</sup>, R. Gustinetti<sup>1</sup>, P. Dominoni<sup>1</sup>, M.G. Lucà<sup>2</sup>, G. Gaffuri<sup>2</sup>, S. Faggiuoli<sup>2</sup>, C. Ottomano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. Ospedali Riuniti, Bergamo

<sup>2</sup>U.O. Gastroenterologia, A.O. Ospedali Riuniti, Bergamo

**Obiettivo.** Lo studio dei liquidi biologici, di grande importanza clinica, è spesso richiesto in regime di urgenza. L'ematologia automatizzata ha vantaggi di rapidità, standardizzazione ma la presenza di macrofagi o cellule mesoteliali può limitarne accuratezza di conteggio e differenziazione cellulare. Scopo del lavoro è stato di valutare Sysmex XE-2100 rispetto a Microscopio Ottico in Liquidi Pleurici (LP) e Ascitici (LA) nel conteggio delle cellule nucleate (TNC) e la concordanza rispetto ai cut-off diagnostici previsti dalle Linee Guida CLSI H56-A: 250 Neutrofili/uL in LA, 50% Neutrofili e 50% Linfociti in LP.

**Materiali e Metodi.** 106 campioni di LA (11 da drenaggio) e 10 di LP raccolti in EDTA con cellularità da 61 a 3364 TNC/uL (mediana 285 TNC/uL) sono stati analizzati senza pretrattamento su XE-2100 e a Microscopio con conteggio TNC in camera di Nageotte e classificazione morfologica su vetrino citocentrifugato. La correlazione del conteggio TNC si è valutata con coefficiente Pearson r, regressione Passing-Bablok, Bias Bland-Altman; la concordanza diagnostica rispetto ai cut-off per Neutrofili e Linfociti con kappa-test di Cohen e calcolo di Sensibilità (SE), Specificità (SP), Valore Predittivo Negativo (VPN) e Positivo (VPP). **Risultati.** Il conteggio TNC di XE2100 ha ottima correlazione:  $r=0.99$ ;  $y=0.98x+1.62$ ; Bias -12.1 (IC95% da -29.3 a +5.0). Il parametro Other% di XE2100 (cellule mononucleate ad alta fluorescenza) correla in modo significativo con la % Macrofagi ( $r$  Spearman=0.74;  $p<0.0001$ ). La concordanza diagnostica è elevata (96.5% dei campioni) con valore kappa= 0.90;  $p<0.0001$ , VPN= 98,1%, VPP= 84,6%, SE= 84,6% e SP= 98,1%.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti dimostrano l'utilità di XE2100 per il conteggio cellulare di LA e LP. Buona la concordanza diagnostica, con k-test e Valore Predittivo Negativo elevati che possono rendere praticabile l'impiego di XE2100 per un adeguato screening morfologico. I citogrammi con cluster ben definiti consentono inoltre una valutazione quantitativa affidabile delle popolazioni leucocitarie, in particolare Neutrofili e Linfociti, gli elementi di principale interesse nella diagnostica nei liquidi cavitari.

**Bibliografia**

Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline, CLSI H56-A Vol.26 No.26.

281

### SCREENING OF GENITAL INFECTION BY CHLAMYDIA TRACHOMATIS BETWEEN THREE DIRECT DIAGNOSTIC TECHNIQUES

S. Pignanelli<sup>1</sup>, F. Delucca<sup>1</sup>, A. Shurdhi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Hematology and Oncological Sciences L. & A. Seràgnoli, University of Bologna, Italy

Screening for *C. trachomatis* (Ctr) infection in the lower genital tract may contribute to the prevention of pelvic inflammatory disease in women. The goal was to evaluate three screening techniques of infection by Ctr: Culture, ELISA and RT-PCR. 150 non-consecutive patients (100 male and 50 female) were investigated through urethral or cervical swabs in 2007-2008. Clinical samples (CSs) arrived at our laboratory at 4°C and in 2-sucrose phosphate transport medium for detection of Ctr in monolayers of Rhesus monkey kidney cells (LLCMK2), for detection of genetic material of Ctr in RT-PCR (ABBOTT M2000 sp/rt real-time-PCR) and for antigenic detection by ELISA technique (Dako). The CSs were divided according to symptoms of the patients: CSs with and without associated symptoms.

In this work, to evaluate the sensitivity (Se), specificity (Spe), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the three techniques, we have considered the culture as gold standard diagnostic. The results obtained among the three techniques in 93/150 CSs with symptoms: Culture 70/93 positive CSs, Elisa 67/93 positive CSs (Se 94%, Spe 96%, PPV 98%, NPV 84.6%) and RT-PCR 71/93 positive CSs (Se 100%, Spe 96%, PPV 99%, NPV 100%). The results obtained among the three techniques in 57/150 CSs without symptoms: Culture 50/57 positive CSs, Elisa 45/57 positive CSs (Se 88%, Spe 86%, PPV 98%, NPV 50%) and RT-PCR 50/57 positive CSs (Se 100%, Spe 100%, PPV 100%, NPV 100%). The diagnostic techniques studied show a high sensibility and specificity in symptomatic population, but not in population asymptomatic (ELISA). It is necessary to choose the most appropriate diagnostic techniques for chlamydial screening, according to clinical needs, because, every year in the world, substantial resources are invested to reduce the health and social problems and for a good diagnosis and treatment of this infection too (1).

#### Reference

1. Chlamydia screening among sexually active young female enrollees of health plans-United States, 2000-2007. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 Apr 17;58(14):362-5.

282

### UTILIZZO DELLA TOTAL X-RAY REFLECTION FLUORESCENCE (TXRF) NELLA CONFERMA DI INTOSSICAZIONE DA METALLI PESANTI PER USO INAPPROPRIATO DI TERAPIE AYURVEDICHE

C. Novembrino<sup>3</sup>, R. De Giuseppe<sup>3</sup>, L. Borgese<sup>1</sup>, E. Bontempi<sup>1</sup>, L. Vigna<sup>4</sup>, L. Patrini<sup>4</sup>, M. Pellegatta<sup>2</sup>, F.M. Rubino<sup>5</sup>, L. Depero<sup>1</sup>, L. Riboldi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INSTM, Laboratorio di Chimica per le Tecnologie, Università degli Studi di Brescia

<sup>2</sup>Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro

<sup>3</sup>Dip. di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano

<sup>4</sup>Dip. di Medicina del Lavoro Clinica del Lavoro L. Devoto; U.O. Medicina del Lavoro 1 Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

<sup>5</sup>Dip. di Medicina Chirurgia ed Odontoiatria, Università degli Studi di Milano @H San Paolo

La TXRF è una tecnica potente per l'analisi degli elementi traccia con sensibilità nell'ordine delle ppb, riferite ad alcuni metalli pesanti d'interesse ambientale e tossicologico, con requisiti minimi di preparazione pre-analitica dei campioni. Queste caratteristiche la rendono adatta all'impiego in campi critici quali analisi biologiche e farmaceutiche. Durante il ricovero di un paziente Indiano presso la Clinica del Lavoro "L.Devoto", che presentava segni di intossicazione da metalli pesanti a probabile causa iatrogena per l'uso continuativo da 6 mesi di un preparato Ayurveda, è stato possibile testare la TXRF. E' stata fatta un'indagine mediante HPLC-ICPMS e TXRF sul preparato Ayurveda e con la TXRF sul capello per verificare il nesso causale tra assunzione del farmaco e la sintomatologia. Una porzione di capello di 1 cm è stata tagliata e deposta sul portacampione, in seguito 10 microl di acido nitrico 65% sono stati aggiunti e lasciati asciugare in aria. Il campione così preparato è stato inserito nello strumento per TXRF e misurato per 600 secondi. La medicina solida è stata macinata in un mortaio. Una quantità pesata della polvere macinata è stata poi mescolata ad una soluzione di acqua, un additivo puro ed una quantità opportuna di standard interno che in questo caso è Ga. La determinazione dei metalli tossici più importanti mediante TXRF è risultata quantitativamente comparabile con quella ottenuta mediante ICP-MS. Sia la TXRF che la ICP-MS hanno confermato che il preparato farmaceutico conteneva approssimativamente 30mg/g di Pb e 26mg/g di Zinco, corrispondenti ad una dose totale di tossici ingerita nei 6 mesi di 27g Pb, 23g Zn. L'analisi del capello mediante TXRF ha evidenziato che l'assorbimento dei metalli tossici è recente, compatibile con il dato anamnestico dell'assunzione del preparato Ayurveda.

La TXRF ha evidenziato un'elevata versatilità, la rilevazione degli elementi presenti è rapida e simultanea ed il tempo di misura è molto limitato (alcuni secondi-minuti). Altri vantaggi rispetto alle tecniche convenzionali sono la non distruttività, le elevate accuratezza e sensibilità unite alla richiesta di quantità di campione molto piccole (mg).  
Bibliografia

1. L Borgese Meas Sci Tec; 20 (2009) 084027.

283

### A SIMPLIFIED METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOTAL HOMOCYSTEINE IN PLASMA BY ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY

J. Gervasoni<sup>1</sup>, S. Persichilli<sup>1</sup>, F. Iavarone<sup>1</sup>, S. Papini<sup>2</sup>, C. Zuppi<sup>1</sup>, B. Zappacosta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche "Giovanni Paolo II", Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

**Background.** Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cardiovascular and cerebrovascular diseases. Homocysteine assay is routinely performed by immunometric methods but, even if completely automated, these methods are quite expensive. In this work we developed a rapid method for homocysteine assay using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, easily useful also for large clinical chemistry routines.

**Methods.** The LC-MS/MS system consisted of a TSQ QUANTUM ACCESS triple quadrupole mass spectrometry operating with electrospray ionization (ESI) in the positive mode. Calibration curves (1-500 µM) and plasma samples, containing 50 µM of internal standard (d8-homocystine) were treated with dithiothreitol to reduce disulphide bridges, then with methanol to achieve complete protein precipitation. High Selected Reaction Monitoring (H-SRM) operating at resolution of 0.4 amu (Full Width Half Mass, FWHM) was performed following the transitions m/z 136.0#90.1. Homocysteine-d4 was monitored with the transition m/z 140.0#94.0. Chromatographic separation was achieved in isocratic conditions using a Thermo BioBasic SCX column (150 x 2.1 mm). The mobile phase consisted of methanol/water (9:91 v/v, containing 0.1% formic acid and with 2 mM ammonium formate in water) at flow rate of 0.250 mL/min (35°C). Recovery, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and total imprecision were evaluated. Homocysteine values on 100 plasma samples were compared with those obtained by an HPLC method and an automated immunometric method (Architect Homocysteine Assay).

**Results.** Recovery was higher than 90%; LOD was 0.1 µmol/L, LOQ was 0.5 µmol/L. Total imprecision was lower than 10%. For the comparison study, the LC-MS/MS method showed a good correlation with HPLC ( $Y=1.05X-0.42$ ;  $R^2=0.97$ ), and with the immunochemiluminescent method ( $Y=1.12X+0.75$ ,  $R^2=0.98$ ).

**Conclusion.** Although the immunometric assays show high throughput, the proposed LC-MS/MS method is simpler, faster and more reliable than HPLC methods. Moreover, low reagent costs together with the relative simplicity of sample preparation make this method well suited, not only for research, but also for routinely work. In this way the cost of the equipment could be paid off within two or three years.

284

### ANALISI AUTOMATICA DEL SEDIMENTO A CAMPO INTERO NELL'ESAME CHIMICO FISICO E MICROSCOPICO DELLE URINE

R. Falbo<sup>1</sup>, V. Proserpio<sup>1</sup>, M. Bertona<sup>1</sup>, P. Brambilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio, Desio

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano Bicocca, Milano

**Introduzione.** L'incremento dei carichi di lavoro, conseguente al consolidamento ed alla centralizzazione dei laboratori, trova un importante ausilio nei sistemi automatizzati di analisi. Lo sviluppo tecnologico ha permesso di introdurre l'automazione anche nell'esame microscopico delle urine.

**Scopo.** Valutare un sistema automatizzato per l'analisi del sedimento urinario in un laboratorio che processa circa 350 campioni di urine al giorno.

**Materiali e Metodi.** L'analizzatore automatico Aution MAX, integrato con il sediMAX (A. Menarini Diagnostics) è stato impiegato per valutare 313 campioni. I risultati ottenuti in microscopia manuale sono stati confrontati con quelli ottenuti con il sediMAX per i seguenti elementi: emazie, leucociti, cellule squamose, cellule epiteliali non squamose, flora batterica, miceti, cilindri ialini, cilindri patologici, cristalli di calcio ossalato, cristalli di fosfato triplo. È stato poi valutato su 846 campioni l'impatto clinico dell'omissione dello studio del sedimento urinario quando l'esame chimico fisico non evidenzia la presenza di: emoglobina, esterasi leucocitaria, nitriti e proteine.

**Risultati.** Il livello di concordanza ottenuto tra la microscopia manuale ed il sediMAX era elevato per emazie (59/64, 93%), leucociti (72/83, 87%) e cellule squamose (63/74 85%); buono per cristalli di calcio ossalato, flora batterica e cilindri patologici; basso per miceti, cilindri ialini, cellule epiteliali non squamose e cristalli di fosfato triplo. In 343 su 846 campioni (41%) l'esame chimico fisico non ha rivelato la presenza di: emoglobina, esterasi leucocitaria, nitriti e proteine; mentre il 13% (45/343) di questi ha evidenziato sia in microscopia manuale che con sediMAX leucociti (7%, 23/45), e/o batteri (6%, 21/45), e/o emazie (3%, 9/45), e/o cilindri (1%, 5/45).

**Conclusioni.** La buona concordanza per emazie e leucociti permette di utilizzare con vantaggio l'analizzatore automatico sediMAX e di migliorare l'organizzazione del laboratorio. I nostri dati suggeriscono l'esame del sedimento urinario anche quando l'esame chimico fisico è negativo.

**Bibliografia**

1. Kouri T, et al. Scand J Clin Lab Invest 2000;60:1-96. Si ringrazia la collaborazione del sig.na Ilaria Beretta e tutto il personale tecnico del settore urine.

285

**CONFRONTO TRA L'EQUAZIONE MDRD E LA FORMULA CKD-EPI PER LA VALUTAZIONE DI EGFR**T. Suppa<sup>1</sup>, G. Lobreglio<sup>1</sup>, D. Turco<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O. Medicina di Laboratorio, A.O. Cardinale G. Panico, Tricase (LE)

Introduzione. A causa della non linearità della relazione tra valori sierici di creatinina e della funzione del rene, nel tempo sono state proposte diverse equazioni basate anche su altri parametri per la stima del GFR, con variabili prestazioni rispetto alla clearance di marcatori di filtrazione esogeni. Questo studio ha lo scopo di confrontare una nuova formula con l'equazione MDRD per il calcolo del GFR.

Materiali e Metodi. Il calcolo del GFR è stato eseguito su 28236 campioni pervenuti da degenti delle U.O. dell'A.O. (67%) e da soggetti ambulatoriali (33%) di età compresa tra 18 e 75 anni (14149 maschi e 14087 femmine). La creatinina sierica è stata misurata mediante il metodo cinetico Jaffè e ricalibrazione con metodi IDMS tracciabili, su analizzatori Beckman Coulter. Il GFR è stato stimato con l'equazione MDRD:  $175 \times [\text{Creatinina}]^{-1,154} \times (\text{Età in anni})^{-0,203} \times (0,742 \text{ se femmina}) \text{ e } \times 1,210 \text{ se afro-americano}$ , e con la nuova equazione CKD-EPI proposta da Levey et al:  $a \times (\text{Creatinina sierica}/b)^c \times (0,993)^{\text{età}}$ , dove "a" dipende da etnia e sesso, "b" dal sesso e "c" dal sesso e dal valore di creatinina sierica. Il confronto tra il GFR stimato con le due equazioni è stato eseguito sia su tutti i campioni che, separatamente, sui campioni con GFR < a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> e con GFR compreso tra 60 e 130.

Risultati. La mediana del GFR calcolato con l'equazione MDRD è risultata di 80,8 ml/min su tutti i campioni, di 38,4 su 8285 campioni con GFR<60 e di 90,6 su 19951 campioni con GFR tra 60 e 130 ml/min; le mediane ottenute con la nuova formula sono state rispettivamente di 81,21; di 35,6 e di 91,15.

Discussione e Conclusioni. Dai dati ottenuti risulta che l'equazione MDRD e la nuova equazione CKD-EPI, proposta per la valutazione più accurata della funzionalità renale, presentano comportamenti differenti nell'ampio spettro di valori di GFR; per GFR<60 le mediane ottenute con l'equazione MDRD risultano più elevate, mentre per valori di GFR tra 60 e 130 la mediana calcolata con la formula CKD-EPI risulta modestamente più elevata, a conferma della sottostima del GFR calcolato con MDRD per questi valori di clearance renale.

**Bibliografia**

Levey et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-612.

286

**DOSAGGIO DELLA CALCEMIA CORRETTA SU AU600 OLYMPUS**A. Latte<sup>1</sup>, G. Cangiano<sup>1</sup>, M. Russo<sup>1</sup>, F. Forte<sup>1</sup>, E. Di Maina<sup>1</sup>, C.I. Pandelli<sup>1</sup>, M.M. D'Ambrosio<sup>1</sup>, C. Sforza<sup>2</sup>, M. D'Amora<sup>3</sup>, A. Risitano<sup>1</sup><sup>1</sup>Lab. Patologia Clinica, Osp. dei Pellegrini ASL NA 1<sup>2</sup>U.O. Nefrologia, Osp. dei Pellegrini ASL NA 1<sup>3</sup>Lab. Patologia Clinica, Osp. degli Incurabili ASL NA 1

Una delle complicanze più frequenti in corso di insufficienza renale cronica (IRC) è rappresentata dall'iperparatiroidismo secondario (IPTS): l'incremento dei livelli sierici di PTH è comunemente causa di danno a carico del tessuto osseo (osteodistrofia renale). In corso di IRC, l'ipocalcemia, l'iperfosforemia e il deficit di calcitriolo - 1,25(OH)2D3 - sono i tre fattori direttamente coinvolti nel determinare l'IPTS.

Nel plasma il calcio esiste in due forme principali, legato alle proteine (circa il 46%) e ionizzato (circa il 47%), e solo quest'ultimo è fisiologicamente attivo. La maggior parte dei laboratori misura la concentrazione di calcio totale e, se non è possibile ottenere il dosaggio del calcio ionizzato con potenziometria, si può utilizzare con buona approssimazione il calcio "corretto" con l'albumina, espresso dalla seguente formula:  $\text{calcio corretto (espresso in mg/dl)} = \text{calcio (espresso in mg/dl)} + 0,8 \cdot (4 - \text{albumina (espressa in g/dl)})$ .

Nel lavoro da noi rappresentato, viene correlato il dosaggio fotometrico dell'albumina (y - metodo al verde di bromocresolo della ditta Olympus) con quello estrapolato dall'elettroforesi sieroproteica (x - metodo Sebia) ( $y=1,3164x - 1,5186$ ;  $r^2=0,9225$ ). L'analisi effettuata su 58 pazienti dializzati afferenti presso la Nefrologia del P.O. dei Pellegrini ASL NA 1 mette in evidenza che nei soggetti con ipoalbumina (circa l'88%) diventa particolarmente importante la valutazione della calcemia corretta perché la correzione effettuata riporta, nei soggetti malnutriti (albumina inferiore a 3,5 g/dl), valori nell'ambito del range di normalità compreso tra 8.4 e 9.5 mg/dl così come consigliato dalle linee guida della Q/DOQI (National Kidney Foundation).

La valutazione clinica del paziente dializzato malnutrito e l'utilizzo della calcemia corretta con albumina fotometrica contribuiscono alla scelta di una più adeguata terapia con calcitriolo e calciomimetici.

**Bibliografia**

Carnevale V, Pipino M, Antonacci M, et al. Prevalence of hypercalcemia in hospitalised patients: effects of "correction" for serum albumin values. *Journal of endocrinological investigation*, 2005;28:15-7.

287

**LA BANCA DI CAMPIONI BIOLOGICI DEL  
CEINGE BIOTECNOLOGIE AVANZATE: LA  
CRIOCONSERVAZIONE E LA GESTIONE TECNICA**

M. Schiattarella<sup>1</sup>, A. Scotto di Frega<sup>1</sup>, M. Romano<sup>1</sup>, A. Morgante<sup>1</sup>, P. Mirabelli<sup>1</sup>, G. Fortunato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia e Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Introduzione.** Le Biobanche consentono l'utilizzazione di materiale biologico adeguatamente raccolto, crioconservato e catalogato, costituendo uno strumento fondamentale per studi prospettici nel campo della medicina e della biologia. La Banca dei Campioni Biologici del CEINGE, certificata secondo le norme ISO 9001/2000, utilizza tecnologie atte a garantire le migliori condizioni di stoccaggio del materiale biologico nonché la massima sicurezza degli operatori.

**Materiali e Metodi.** La Biobanca dispone di una sala criogenica dotata di 9 contenitori di capacità 300-600 litri, equipaggiata con sistemi di monitoraggio, inseriti in un sistema centralizzato di gestione remota, e dotata di un moderno impianto di climatizzazione per il ricircolo e il trattamento dell'aria filtrata. Presso la Biobanca vengono crioconservati campioni biologici umani come cellule staminali cordonali, cellule vitali da sangue periferico e midollare, campioni di DNA/RNA di pazienti affetti da patologie genetiche, nonché linee cellulari continue umane e animali. La Biobanca dispone di circa 3000 campioni di pazienti affetti da patologie genetiche, prevalentemente disordini neuromuscolari e cardiovascolari. La Biobanca fornisce linee cellulari linfoblastoidi per l'analisi funzionale di mutazioni identificate in pazienti affetti da disordini genetici. Per l'acquisizione, la tipizzazione, la conservazione e la distribuzione di campioni biologici, la Biobanca adotta procedure standardizzate secondo le linee guida dell'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (1).

**Conclusioni.** La Biobanca del CEINGE è in grado di supportare numerose attività relative a raccolta, caratterizzazione, crioconservazione e distribuzione di campioni biologici. Uno dei principali obiettivi della Biobanca è quello di favorire l'interazione tra i diversi gruppi di ricerca e tra le diverse Biobanche Europee. Nel 2009, la Biobanca del CEINGE è entrata a far parte di un progetto di collaborazione tra Biobanche finanziato dalla commissione Europea: Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure in modo tale da ottimizzare l'uso di risorse finanziarie, professionali e tecnologiche.

**Bibliografia**

1. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres, 2007.

288

**STUDIO DI INCIDENZA DI VULVOVAGINITI  
MICOTICHE E BATTERICHE IN GIOVANI DONNE**

M. Laneve<sup>1</sup>, M.G. Tinelli<sup>1</sup>, L. Tursi<sup>1</sup>, A. Francavilla<sup>1</sup>, R. Intermite<sup>1</sup>, B. Grossi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, P.O. Occidentale, Mottola (Ta), ASL TA

**Introduzione.** Le malattie sessualmente trasmesse (MST) sono patologie per le quali il contagio sessuale rappresenta la via di trasmissione più importante. I microrganismi responsabili sono eterogenei: si tratta di batteri, virus, protozoi, miceti. Le flogosi vulvo-vaginali sono più frequenti durante l'adolescenza perchè in epoca adolescenziale si verifica l'inizio dell'attività sessuale. Ciò rende la vagina più suscettibile ad alterazioni del normale ecosistema e microrganismi patogeni prendono il sopravvento diventando responsabili di vulvo-vaginiti. Questo studio vuole valutare l'incidenza di infezioni batteriche e micotiche vulvo-vaginali nelle giovani donne nell'ambito della popolazione del nostro territorio.

**Materiali e Metodi.** Tra maggio 2008 – maggio 2009 abbiamo esaminato i tamponi vaginali di 422 donne, di età compresa tra 18 e 35 anni, ambulatoriali esterni. Per l'isolamento dei microrganismi si è proceduto a semina sui seguenti terreni di coltura solidi (bioMerieux): Agar (A.) sangue CNA, A. MSA 2, A. Mac Conkey, A. Sabouraud, A. CAN 2, A. GAR 2. L'identificazione biochimica dei germi è stata ottenuta con i sistemi ID 32 E, ID 32 C, ID 32 Strep e ID 32 Staph (bioMerieux).

**Risultati.** Dei 422 tamponi 185(43%) sono risultati positivi: il 37% per lo Streptococco (Strep.) beta-emo litico (b-em.) di gruppo (gr.) B o Agalactiae, il 20% per lo Strep. b-em. gr. D, il 3% per gli altri gruppi di Strep., il 23% per la Candida albicans, il 5% per l'Escherichia coli, il 5% per lo Staphylococcus sp., il 7% per la Gardnerella vaginalis.

**Conclusioni.** I nostri risultati evidenziano che i germi più frequentemente isolati nelle infezioni vulvo-vaginali sono lo Strep. gr. B (37%) e Candida albicans (23%). Possiamo perciò affermare che le infezioni vulvo-vaginali, trasmesse sessualmente, costituiscono un problema molto rilevante se rapportato al numero di giovani donne che ne sono affette, alla scarsa conoscenza della modalità di contagio delle MST e alle complicità che possono determinare. Pertanto il Laboratorio di Patologia Clinica mantiene un ruolo fondamentale nella prevenzione dei danni che queste infezioni possono causare non solo a breve termine, ma anche a medio-lungo termine nella prospettiva di una gravidanza.

289

### APPROPRIATEZZA NELLA VALUTAZIONE PREOPERATORIA IN CHIRURGIA ELETTIVA: ESPERIENZA DEL GRUPPO GIOMI DI FIRENZE

F. Balboni<sup>1</sup>, L. Baggiani<sup>2</sup>, V. Pasquini<sup>1</sup>, A. Tomei<sup>1</sup>, R. Mantellassi<sup>1</sup>, E. Gabbai<sup>2</sup>, S. Sbaragli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Direzione Sanitaria, Laboratorio Analisi, Servizio Anestesia, A.F. Medicina IFCA

<sup>2</sup>Direzione Sanitaria, Servizio Anestesia S. Chiara

Negli ultimi anni, grazie all'affermarsi della EBM e alla necessità di razionalizzare le risorse, pur mantenendo il miglior outcome per il paziente, si è ritenuto necessario rivalutare in termini di efficacia e quindi, di appropriatezza gli interventi diagnostici. Nel Gruppo GIOMI di Firenze ciò ha comportato la revisione, nella casistica di chirurgia elettiva, delle indagini preoperatorie. Ciò è stato realizzato con il supporto di un gruppo di lavoro multidisciplinare, costituito nell'Aprile 2008, composto dalla Direzione Sanitaria IFCA e S. Chiara, dai Responsabili di Anestesia, da un Infettivologo e dal Responsabile del Laboratorio.

Scelta prioritaria nella stesura del documento è stata l'eliminazione totale degli screening virologici, la netta riduzione degli esami richiesti e il raggruppamento dei molteplici pannelli esistenti in due soli blocchi.

In base alle migliori evidenze scientifiche e di letteratura, il gruppo di lavoro ha concordato i protocolli preoperatori comuni al Gruppo GIOMI di Firenze.

Il presente lavoro confronta i dati, in termini economici, di un semestre conseguente all'introduzione della nuova procedura rispetto ai costi imputabili alla precedente.

L'utilizzo della nuova procedura ha permesso un risparmio complessivo nel presidio IFCA di circa 51.000 euro per 1554 interventi effettuati di cui 783 per chirurgia oculistica, ambulatoriale ortopedica e day surgery e 771 per chirurgia ortopedica protesica, addominale maggiore, osteotomia, interventi maggiori sul capo e sul collo. Nel presidio S. Chiara, su 1683 interventi effettuati, il risparmio è stato di circa 10.000 euro per 1341 interventi per chirurgia ortopedica protesica e urologia e 342 per chirurgia oculistica, ambulatoriale ortopedica e day surgery.

Non si è avuto nessun evento avverso con l'utilizzo della nuova procedura né per gli operatori né per i pazienti valutati in sede di visita anestesiológica avvalendosi di un'accurata anamnesi per escludere patologie concomitanti.

Ministero della Salute: Valutazione preoperatoria del paziente da sottoporre a chirurgia elettiva Linee Guida Nazionali di riferimento 2004

290

### STATISTICA, FIGLIA DI UN DIO MINORE: APPELLO A SIBioC

M. Vidali<sup>1</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

L'uso scorretto della statistica in qualsiasi fase di un lavoro scientifico rischia di compromettere la corretta interpretazione del fenomeno in studio. In questo lavoro abbiamo analizzato l'appropriatezza dei metodi statistici utilizzati nei recenti articoli pubblicati su *Biochimica Clinica* (BC). Gli autori di questo abstract, soci SIBioC, non sono interessati ad una sterile polemica, quanto piuttosto a contribuire in prima persona al miglioramento della qualità scientifica della nostra Società.

Tutti i 46 Contributi Scientifici di BC nel periodo gen 2007 - ago 2009 sono stati valutati secondo i seguenti criteri: presenza della descrizione delle tecniche statistiche e/o del software utilizzati, appropriatezza dei test e di eventuali grafici e/o tabelle.

5 dei 46 articoli non erano valutabili per l'assenza di dati statistici. Sebbene le norme per gli autori richiedano di indicare dettagliatamente i metodi utilizzati, solo 20 (di cui 12 parzialmente) dei 41 lavori esaminati contenevano un paragrafo nella sezione Metodi con l'indicazione dei test adottati. Dei rimanenti 21, 5 e 8 riportavano rispettivamente informazioni complete o parziali in altre parti del testo, mentre in 8 non era presente alcuna indicazione. Solo in 2 vi era l'indicazione del software utilizzato; in almeno 15, in base ai grafici presentati, era ipotizzabile l'uso di Microsoft Excel, che numerose pubblicazioni mostrano contenere algoritmi statistici non accurati. In 23 i metodi statistici applicati erano formalmente corretti, mentre i restanti 18 non erano valutabili per mancanza di informazioni o utilizzavano metodi inadatti o presentavano violazioni delle assunzioni dei test utilizzati. Nel complesso grafici e tabelle erano corretti ed informativi, ad eccezioni di pochi lavori con tipologie di grafici scorrette o sconsigliate.

I dati evidenziano la necessità di una revisione sistematica delle attuali norme per gli Autori e suggeriscono l'opportunità di istituire un gruppo di lavoro con il compito di preparare linee guida dettagliate per la pubblicazione ed il referaggio ed organizzare momenti formativi su metodologie statistiche inerenti alla Medicina di Laboratorio. Bibliografia

McCullough BD et al. *Computational Statistics and Data Analysis* 2008;52:4570-8.

291

### CONFRONTO TRA TEST SIEROLOGICI PER HBSAG E HCV SU SISTEMI AUTOMATICI

C. De Rango<sup>1</sup>, R. Gianello<sup>1</sup>, D. Dusi<sup>1</sup>, C. Molinari<sup>1</sup>, R. Faccoli<sup>1</sup>, C. Vaccari<sup>1</sup>, M.R. Badinelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Fondazione Poliambulanza Istituto Ospedaliero, Brescia

Introduzione e scopo del lavoro. Abbiamo inteso confrontare le prestazioni analitiche di due sistemi automatici con lettura in chemiluminescenza (ADVIA Centaur, Siemens Healthcare Diagnostics e Architect, Abbott Diagnostics) per le analisi di alcuni marcatori sierologici di infezione da virus HBV, HCV.

Metodi. Campioni di "routine" (n= 325) sono stati analizzati in parallelo con i due sistemi. I campioni reattivi discordanti, per HBsAg e anti-HCV sono stati analizzati con test di conferma.

Risultati. A) HBsAg: sono stati analizzati 153 campioni dei quali inizialmente 3 risultavano positivi con Architect e negativi con Centaur e 1 negativo con Architect e positivo con Centaur. Dopo centrifugazione dei campioni e ripetizione dei 3 positivi con Architect questi risultavano negativi dopo valutazione con test Confirmatory. Il campione negativo con Architect è risultato positivo con il test Confirmatory. Su 153 campioni la concordanza era del 99,35%; B) Anti-HCV: sono stati analizzati inizialmente 172 campioni di cui risultavano 166 concordi: i discordanti erano 6 di cui 5 sono risultati indeterminati al test di conferma Immunoblotting e pertanto, sono stati esclusi dalla valutazione statistica. Il campione positivo con Centaur e negativo con Architect è stato confermato in Immunoblotting, rilevando così, una migliore sensibilità per il test su Centaur. Su 168 campioni la concordanza era del 99,40%.

Conclusioni. A fronte di una buona correlazione tra i test eseguiti sulle due apparecchiature, è da sottolineare una più elevata sensibilità dei test eseguiti su Centaur, soprattutto per quanto riguarda HbsAg. Infine, Centaur ha rilevato una maggiore affidabilità analitica, legata all'utilizzo di puntali monouso.

#### Bibliografia

Evaluation of Precision Performance of Qualitative Measurement Methods; Approved Guideline - Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004. NCCLS Document EP5-A2.

292

### GLUTATIONIL-EMOGLOBINA QUALE INDICATORE DI STRESS OSSIDATIVO IN SOGGETTI FORTI FUMATORI

R. De Giuseppe<sup>1</sup>, F.M. Rubino<sup>2</sup>, E. Caneva<sup>3</sup>, C. Novembrino<sup>1</sup>, F. de Liso<sup>1</sup>, L. Vigna<sup>4</sup>, M. Pellegatta<sup>4</sup>, F. Bamonti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Mediche, Univ. Studi di Milano, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E, Milano

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Chirurgia ed Odontoiatria Univ. Studi di Milano, H San Paolo

<sup>3</sup>CIGA Univ. Studi di Milano

<sup>4</sup>U.O. Medicina del Lavoro 1 Clinica del Lavoro L Devoto, Fondazione IRCCS O.M.P.Ma.R.E, Milano

La glutationil-emoglobina (HbSSG) è il prodotto della reazione dell'emoglobina eritrocitaria (HbSH) con il disolfuro del glutatione. Questa forma minore di emoglobina è naturalmente presente negli eritrociti in quantità analoga a quella dell'emoglobina glicata e può essere misurata con le medesime tecniche strumentali direttamente da un microprelievo di sangue periferico. La HbSSG è un biomarcatore innovativo di stress ossidativo sia in vitro che in vivo, in quanto è riportato aumentare nel diabete scompensato, nella nefropatia e nella dislipidemia.

Soggetti e Metodi. Venivano esaminati 30 soggetti forti fumatori (>20 sigarette/die da almeno 10 anni; 15M/15F, età media 45,5±8 anni; quadri spirometrici nella norma), paragonabili per sesso, età e numero di sigarette fumate. La determinazione della HbSSG veniva effettuata secondo il metodo di Biroccio et al., parzialmente modificato, che utilizza l'analizzatore Bruker Autoflex III (Bruker Daltonics, Brema, Germania), sul quale erano registrati gli spettri di massa dei campioni ionizzati ottenuti irradiando una miscela di emolizzato eritrocitario e di matrice (ac. sinapico) cristallizzata sulla piastra porta-campioni. La percentuale del rapporto [HbSSG]/[HbSH] veniva calcolata dall'intensità dei segnali corrispondenti alle specie β-Hb (m/z 15868) e β-HbSSG (m/z 16174).

Risultati. In generale, nel limitato numero di soggetti esaminati risultava una percentuale media di HbSSG di 6,4±1,7% senza differenza tra sessi e numero di sigarette fumate. Tuttavia, i soggetti con un consumo di sigarette superiore a 20/die presentavano una maggior % di HbSSG rispetto a quelli che ne fumavano 20/die (7,0±1,4% vs 5,7±1,1%; p<0,055). Questi risultati preliminari concordavano con i valori riscontrati nello studio di Biroccio et al. in 184 soggetti italiani nei quali il 65% presentava valori di HbSSG inferiori a 0,5% (cut-off), il 35% presentava valori di HbSSG compresi tra 1,6-5,2% (10°-90° percentile) ed il 3% circa superiori a 5,2%.

Conclusioni. I risultati di questo studio pilota suggeriscono che la HbSSG possa essere impiegata quale indicatore biologico di stress ossidativo anche in condizioni non patologiche quale l'abitudine al fumo di sigaretta.

Biroccio A et al. Anal. Biochem 2005, 336:279.

293

**IDENTIFYING AND MONITORING ERRORS DURING THE PRE-ANALYTIC PHASE**A.M. Basile<sup>1</sup>, S. Tundo<sup>1</sup>, P. Maselli<sup>1</sup><sup>1</sup>Division of clinical pathology "Miulli" Hospital, Acquaviva delle Fonti, Bari

Goal. Optimizing the pre-analytic process in the laboratories according to the UNI EN ISO 9001:2000 model, in order to guarantee a clinical effective management and a better outcome of the patients.

Methodology. Creating a legend of the pre-analytic errors (PAE) and gathering data concerning 2008 and the first semester 2009, we have proceed in the following order: PAE systematic characterization stratifying them in typology and origin;

PAE counting relating to the number of the examinations; comparison of the results with the maximum level of acceptability;

activation of corrective actions;

verification of effectiveness through the comparison of the first semesters 2008/2009.

Results. In 2008 1.671.975 examinations have been distributed facing 168.842 requests.

3540 PAE have been detected, related to the requests, and 2472 PAE related to the samples.

The most important typology of PAE related to the requests and samples have been:

Multiple requests of the same patient (41.2%)

Not-transferred request (31%)

No correspondence between the request identification in the DNLAB and the barcode (10.3%)

Wrong request date (9.2%)

Incomplete request (eg. Lacking of diuresis)(8.2%)

Inadequate relation blood additive (23%)

Haemolysed sample (9.7%)

Coagulated sample (7.28%)

Not appropriate temperature for samples preservation during the transport (8.4%)

Empty test-tube (6.8%).

Conclusion. Thanks to the analysis and the stratification of the gained information, has been possible identifying the most frequent typology of PAE and where they come from. The opportune corrective actions, the daily interaction with the departments (units) and the propulsion of a formative event (addressed to all the unit staff in charge for the computerized request formulation) have registered in the first months of 2009 a drastic decreasing of PAE (see above), confirming that the audit and the exchanging information procedures are effective in the improvement of patient outcome.

Bibliografia

Crupi V, Gensini G, Motterlini M. La dimensione cognitiva dell'errore in medicina. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore; 2006

Health Grades <http://www.healthgrades.com>

Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med 2006.

294

**DOSAGGIO DEI BICARBONATI NEL PAZIENTE NEFROPATICO**F. Balboni<sup>1</sup>, B. Morrocchi<sup>1</sup>, F. Mazzucconi<sup>1</sup>, B. Salani<sup>3</sup>, V. Montemurro<sup>1</sup>, B. Tosi<sup>2</sup><sup>1</sup>Lab. Analisi e Centro Dialisi Ulivella, IFCA Firenze<sup>2</sup>DAI Specialità Medico-Chirurgiche, Nefrologia dei Trapianti e Dialisi, AOUC, Firenze<sup>3</sup>DAI Emergenza Accettazione e Accoglienza, Agenzia Geriatrica, AOUC, Firenze

Nell'insufficienza renale con l'iniziale riduzione del filtrato glomerulare si ha una riduzione dell'eliminazione del carico acido giornaliero, ma il bilancio di idrogeno è comunque mantenuto con un aumento dell'escrezione di ioni ammonio da parte dei nefroni ancora funzionanti. Quando il filtrato scende al di sotto dei 40-50 ml/min si perde la capacità di riassorbire ioni bicarbonato e di eliminare ioni ammonio; compare quindi l'acidosi metabolica per l'incapacità da parte del rene di eliminare completamente il carico acido giornaliero. Quando il paziente presenta una insufficienza renale in stadio avanzato, la concentrazione di bicarbonato scende inesorabilmente fino a stabilizzarsi intorno a valori di 18-20 mmol/l. E' riportato in letteratura che nei pazienti critici con valori estremi di PCO2 il valore calcolato di bicarbonatemia non è attendibile.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare due metodiche diverse per il dosaggio dei bicarbonati: il sistema per emogas GEM Premier 3000 IL, che calcola i bicarbonati mediante la formula di Handerson-Hasselback da pCO2, pH e CO2 totale; e il kit Bicarbonate Olympus che misura i bicarbonati nel siero e nel plasma con metodica enzimatica. 206 campioni provenienti da pazienti in emodialisi sono stati analizzati sull'analizzatore GEM Premier 3000 IL e sull'analizzatore AU400 Olympus.

I risultati mostrano una buona correlazione fra le due metodiche per i campioni analizzati prima della dialisi (R di Pearson: 0.819, p<0.01) e per i campioni fine dialisi (R di Pearson: 0.576, p<0.01). L'analisi di Bland Altman fra calcolato e misurato mostra una differenza media di 0.84 mmol/l con una ds di 1.15 prima della dialisi e di 2.76 con una ds di 1.35 dopo dialisi.

Come riportato in letteratura la metodica misurata, pur essendo più accurata soprattutto nei pazienti critici, risulta essere più complessa nella sua gestione in quanto il prelievo è stabile solo se immediatamente centrifugato, separato e mantenuto non esposto all'aria. La metodica calcolata fornisce invece, pur essendo un valore ricavato, dati attendibili e in più offre una valutazione più semplice e immediata.

Bibliografia

Rombolà G. Aspetti Tecnici in Nefrologia. Omeostasi acido-base 2001;15.

295

**CSF HOMOCYSTEINE LEVELS AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**G. Bivona<sup>1</sup>, F. Valentino<sup>2</sup>, C. Bellia<sup>1</sup>, B. Lo Sasso<sup>1</sup>, V. La Bella<sup>2</sup>, M. Ciaccio<sup>1</sup><sup>1</sup>*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo, Italia*<sup>2</sup>*Centro Regionale di Riferimento SLA, Dip. di Neuroscienze Cliniche, Palermo, Italia*

**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  $\lambda$  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  $\mu\text{mol/L}$ , slightly lower from that of the controls (0.56 + 0.12  $\mu\text{mol/L}$ , - 14.2%, p = ns). CSF HC in ALS was not 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;70:222-5.

296

**UNITÀ HOUNSFIELD NELLA DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA DEI CALCOLI URINARI**M. Bagnati<sup>1</sup>, M. Vidali<sup>1</sup>, M. Albertario<sup>1</sup>, N. Atzeni<sup>1</sup>, D. Scarano<sup>1</sup>, P. Porta<sup>1</sup>, G. Tornotti<sup>1</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup><sup>1</sup>*Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara*<sup>2</sup>*Divisione Universitaria di Urologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara*

**Introduzione e Scopo.** Recenti studi hanno suggerito che la TC possa essere utilizzata per predire la composizione chimica dei calcoli, in base alla radiodensità (espressa in unità Hounsfield HU), supportando il clinico nella scelta nella strategia terapeutica più opportuna. Scopo del lavoro è stato confrontare la radiodensità e la composizione chimica dei calcoli al fine di individuare cut-off di HU dotati di alta specificità.

**Materiali e Metodi.** 77 pazienti con calcolosi reno-ureterale, candidati a litotripsia percutanea o a ureteroscopia operativa, sono stati studiati preoperatoriamente con TC senza mdc, valutando dimensioni e radiodensità dei calcoli. L'analisi chimica è stata effettuata mediante kit colorimetrico validato in spettrometria IR.

**Risultati.** L'analisi chimica ha evidenziato ossalato di calcio (Ox-Ca) in 44 (57%), ossalato e fosfato di calcio (Ox/P-Ca) in 12 (16%), acido urico (Ur) in 4 (5%), Ur/Ox-Ca in 9 (12%), struvite e P-Ca in 3 (4%), struvite e Ox-Ca in 4 (5%) e cistina in 1 (1%). I calcoli contenenti acido urico (Ur +Ur/Ox-Ca, n=13; HU 487, IQR 352-594) presentavano valori mediani di densità significativamente minori rispetto ai calcoli di Ox-Ca puri (n=44; HU 639, IQR 460-942) (p=0,012) e a quelli contenenti fosfato (Ox/P-Ca+struvite, n=19; HU 801, IQR 502-1205) (p=0,006); nessuna differenza significativa era evidente tra i calcoli di ossalato e quelli contenenti fosfato. Le aree sotto le curve ROC per calcoli di acido urico o contenenti fosfato erano rispettivamente 0,73 (95%IC 0.59-0.87) e 0,62 (95%IC 0.46-0.79). Cut-off pari a 352 e 1205 HU permettono di identificare calcoli contenenti acido urico oppure fosfati con una specificità rispettivamente del 91% e del 96%.

**Conclusioni.** Sebbene i dati evidenzino un'associazione tra radiodensità e composizione chimica, l'ampia sovrapposizione delle distribuzioni dei valori di HU ne limita notevolmente l'applicazione clinica. Tuttavia, è possibile individuare cut-off specifici utili nell'individuazione di calcoli di acido urico e fosfati. Una casistica più numerosa è necessaria al fine di calcolare cut-off più accurati.

**Bibliografia**Ruggera L. et al. Unità Hounsfield e composizione chimica dei calcoli. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* 2009; 81(1):S1.

297

### VALUTAZIONE DELL'ANALIZZATORE DEL SEDIMENTO URINARIO IRIS IQ200 PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE URINARIA IN PAZIENTI PEDIATRICI

R. Luciano<sup>1</sup>, S. Piga<sup>2</sup>, M. Argentieri<sup>3</sup>, L. Federico<sup>1</sup>, F. Fina<sup>1</sup>, M. Muraca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Analisi, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>2</sup>Unità di Epidemiologia, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>3</sup>Lab. Microbiologia, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Le infezioni alle vie urinarie (IVU) sono fra le più frequenti in età pediatrica. Il Medico può decidere di iniziare un trattamento antibiotico in base al sospetto clinico, comportamento che può sfociare in un eccesso terapeutico. Sarebbe auspicabile un test in grado di offrire una diagnosi precoce senza attendere i tempi dell'urocoltura, ma anche un semplice test di esclusione (con elevato valore predittivo negativo, VPN) potrebbe migliorare significativamente la gestione del paziente. Il nostro progetto si propone di valutare la sensibilità, la specificità e il valore predittivo negativo e positivo del sistema di microscopia automatizzata intelligente IRIS IQ200TM (Instrumentation Laboratory) combinato con i risultati dell'esame chimico-fisico delle urine, utilizzando come gold standard l'urocoltura, in una popolazione pediatrica ospedaliera. Sono stati analizzati retrospettivamente 474 campioni consecutivi di urine relative a pazienti pediatrici (0-14 anni) dell'OPBG con esame completo delle urine e urocoltura. 69 sono risultati positivi all'urocoltura con prevalenza di infezione del 14.6%. E' stato costruito un modello di regressione logistica multivariata utilizzando sia i valori misurati dal microscopio IQ200TM che quelli dell'esame chimico-fisico. I parametri risultati significativamente associati con la presenza di infezione, oltre all'età <1anno (p<0.001) sono: l'Esterasi Leucocitaria  $\geq 15 \text{Leu}/\mu\text{l}$  (p<0.001), il numero di elementi di piccole dimensioni (EPD)  $>5500/\mu\text{l}$  (p<0.001) e i Batteri  $\geq 3/\mu\text{l}$  (p=0.01). Il VPN del modello è pari al 90% mentre i falsi positivi costituiscono il 3% e i falsi negativi il 7% del campione complessivo. L'area sotto la curva ROC è pari all'80%. Questi risultati hanno consentito la costruzione di uno score (range 0-10). Per un cut-off <4, la sensibilità è del 49% (IC: 44.8%-53.8%) e la specificità del 96% (IC: 94.6%-98.0%), consentendo di escludere la presenza di IVU con un VPN del 92% (IC: 89.3%-94.2%). Per completare lo studio, lo score potrà essere testato in maniera prospettica su una nuova popolazione di pazienti.

#### Bibliografia

Zorc JJ et al. Clin Microbiol Rev 2005;18:417-422.

Hughes C et al. Journal of Clinical Pathology 2003;56:844-849.

298

### CALCOLO DELL'INCERTEZZA PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' CATALITICA DELLA GAMMA-GT: CONFRONTO FRA TRE APPROCCI

E. Guerra<sup>1</sup>, A. Carobene<sup>1</sup>, C.A. Ferrero<sup>1</sup>, F. Ceriotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Laboratorio standardizzazione, IRCCS H. San Raffaele, Milano

Il calcolo dell'incertezza di misura è un requisito fondamentale per un laboratorio di riferimento, ma è indicato anche dalla standard ISO 15189 per i laboratori di routine. Scopo del lavoro è verificare alcuni approcci alternativi per il calcolo dell'incertezza applicati alla misura della concentrazione di attività catalitiche della  $\gamma$ GT nel siero. Approccio 1 secondo il GUM (1): individuare tutte le fonti di variabilità che influenzano la misura (assorbanza, lunghezza d'onda, pH, temperatura, volume, concentrazione e lotto dei reagenti, ripetibilità), quantificarle in termini di SD e combinarle per ottenere la  $u_{(c)}$  incertezza combinata standard. Approccio 2: utilizzare il CV del materiale di controllo interno come stima della variabilità complessiva dato dalle fonti elencate in precedenza ed i risultati della VEQ come stima del bias. Approccio 3: utilizzare i risultati ottenuti dall'analisi ripetuta negli anni di un materiale di riferimento certificato come fonte sia dei dati relativi all'imprecisione che al bias. Per quantificare le variabili secondo l'approccio GUM sono stati eseguiti una serie di esperimenti modificando una variabile alla volta (lunghezza d'onda, ecc).

Risultati. Utilizzando l'approccio 1 l'incertezza espansa è risultata pari a 4.34%, con il 2 a 7.26% e con il 3 a 4.06%. Discussione e conclusioni. I risultati dell'approccio 1 e 3 sono sovrapponibili, mentre il 2 riporta un risultato nettamente più elevato dovuto a due ragioni: i materiali usati nella VEQ e la minore affidabilità del valore di riferimento calcolato come media di consenso. L'approccio 1, soprattutto nelle modalità da noi messe in atto risulta particolarmente impegnativo.

#### Bibliografia

1. JCGM 100: 2008 Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement.

299

### INTEGRATED DIAGNOSTIC APPROACH IN THE METABOLIC SCREENING: THE FIRST CASE OF A MITOCHONDRIAL ACETOACETYL-COA THIOLASE DEFICIENCY IN CAMPANIA

D. Ombrone<sup>1</sup>, E. Scolamiero<sup>1</sup>, F. Catanzano<sup>2</sup>, M. Ruoppolo<sup>1</sup>, C. Di Stefano<sup>3</sup>, N. Nosari<sup>3</sup>, G. Andria<sup>4</sup>, G. Parenti<sup>4</sup>, F. Salvatore<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università del Sannio, Benevento

<sup>3</sup>Osp. Umberto I Nocera Inferiore, Salerno

<sup>4</sup>Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

<sup>5</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli

A newborn screening program to detect inherited metabolic disorders by means of tandem mass spectrometry (1) was started in Campania Region, Italy in 2007. Up to June 2009, 6566 dried blood filter paper samples from 11 hospitals in the region have been screened. The main aim of this approach is early diagnosis and medical intervention for treatable metabolic disorders, in order to minimize severe illness or death within the first few days of life. A very rapid  $\beta$ -KT deficiency diagnosis was performed by analyzing the acylcarnitine profile from a dried blood spot during the above quoted program of metabolic screening in Campania Region. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) analysis of urinary organic acids confirmed the diagnosis. The same metabolic defect was found also in the older sister of the proband.  $\beta$ -ketothiolase ( $\beta$ -KT) deficiency is an autosomal recessive disorder. The disorder is caused by a mutation in a gene localized to chromosome region 11q. The  $\beta$ -ketothiolase, is the last enzyme in the isoleucine degradation pathway, catalyzing the reversible conversion of 2-methylacetoacetyl-CoA into propionyl-CoA and acetyl-CoA. Its function is not confined to the isoleucine degradation pathway. It also has an important role in ketone body metabolism, where its substrate is acetoacetyl-CoA rather than 2-methylacetoacetyl-CoA(2). Patients have ketoacidosis, vomiting, dehydration and lethargy leading to coma. The acidosis may be profound, with blood pH below 7. The age of onset of the first episode is most commonly between 6 and 24 months but may be delayed to later childhood; onset in the neonatal period is extremely rare. The acute episode is often triggered by a febrile illness or gastroenteritis or follows an increased protein intake.

Genomic analysis showed the c.1189C>G mutation in exon 12 of the ACAT1 gene resulting in the p.H397D amino acid change in both alleles of patients.

The latter mutation has been classified as a severe defect because it abolishes the protein expression as demonstrated in an in vitro assays (3).

#### References

1. Chace D. et al. Clin Chem 2003;49:1797-1817.
2. Korman SH. Molecular genetics and metabolism 2006;89:289-99.
3. Zhang GX. et al. Pediatric research 2004;56:60-64.

300

### NEONATAL VITAMIN B12 DEFICIENCY SECONDARY TO MATERNAL SUBCLINICAL VITAMIN B12 DEFICIENCY: REPORT OF A CASE IDENTIFIED BY EXPANDED NEWBORN SCREENING IN THE CAMPANIA REGION

E. Scolamiero<sup>1</sup>, D. Ombrone<sup>1</sup>, F. Catanzano<sup>2</sup>, M. Ruoppolo<sup>1</sup>, C. Di Stefano<sup>3</sup>, N. Nosari<sup>3</sup>, G. Andria<sup>4</sup>, G. Parenti<sup>4</sup>, F. Salvatore<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università del Sannio, Benevento

<sup>3</sup>Osp. Umberto I Nocera Inferiore, Salerno

<sup>4</sup>Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

<sup>5</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli

During our two-year experience of expanded newborn screening pilot program carried on with the contribution of 11 hospitals of the Campania Region spots from more than 5600 infants have been analysed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)(1). Here we report the case of an asymptomatic male patient, born to non-consanguineous parents whose analysis of acylcarnitines in dried blood spot performed on the 4th day of life showed an abnormal profile presenting high concentration of propionylcarnitine. An additional test performed on the neonatal blood spot uncovered the presence of methylmalonic acid(2). Increased urinary methylmalonic acid was also detected when urine organic acid profile was performed as confirmatory test.

These data suggested that the proband was affected by Methylmalonic acidemia that can also results from nutritional vitamin B<sub>12</sub> deficiency, which in neonates is usually due to maternal vitamin B<sub>12</sub> deficiency.

The proband underwent vitamin B<sub>12</sub> supplementation during which acylcarnitine and urine organic acid profile normalized.

Further biochemical investigations revealed low concentrations of serum vitamin B<sub>12</sub> in the mother. We concluded that the infant's positive newborn screening resulted from maternal vitamin B<sub>12</sub> deficiency(3). Daily intramuscular injection of cobalamin corrected the infant's vitamin B<sub>12</sub> deficiency. After the therapy was stopped, propionylcarnitine and methylmalonic acid levels remained normal.

This case shows that newborn screening pilot program allowed the maternal vitamin B<sub>12</sub> deficit presymptomatic diagnosis and preventive treatment avoiding potential irreversible sequelae since even moderate vitamin B<sub>12</sub> deficiency can be harmful for infants central nervous system development.

#### References

1. Chace D. et al. Clin Chem. 2003;49:1797-1817.
2. La Marca G. et al. Clin Chem 2007;53:1364-1369.
3. Marble M. et al. J. Pediatr 2008;152:731-3.