

47° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC - Medicina di Laboratorio)

Firenze, 26-28 ottobre 2015

Riassunti Poster

Codice Poster	Argomento
• P001-P032	Biologia molecolare clinica
• P033-P038	Patologie genetiche
• P039-P060	Ematologia
• P061-P065	Patologie autoimmuni
• P066-P074	Coagulazione
• P075-P077	Sport e nutrizione
• P078-P102	Varie
• P103-P111	Controllo di qualità, standardizzazione, tracciabilità
• P112-P119, P276	Diabete e sindrome metabolica
• P120-P126	Endocrinologia
• P127-P138	Farmacologia e tossicologia
• P139-P148	Gestione del laboratorio, automazione e applicazioni informatiche
• P149-P155	Malattie infettive
• P156-P174	Patologia cardiovascolare
• P175-P199, P180A, P180B, P279-283	Tecnologia, strumentazione e valutazione metodi
• P200-P231	Casi clinici
• P232-P234	Patologie epatiche
• P235-P236	Farmacogenetica
• P237	Patologie neurologiche
• P238-P240	Patologie osteoarticolari
• P241-P245	Patologie renali
• P246-P247	Allergia
• P248-P251, P277	Gravidanza, neonatologia e pediatria
• P252-P270, P278	Patologia oncologica
• P271-P275	Analisi decentrate

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

P001

FEASIBILITY OF A WORKFLOW FOR THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SINGLE CIRCULATING TUMOR CELLS BY NEXT GENERATION SEQUENCING

F. Salvianti¹, G. Rotunno², F. Galardi³, F. De Luca³, M. Pestrin³, A.M. Vannucchi², A. Di Leo³, M. Pazzagli¹, P. Pinzani¹

¹Dip. Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche, Università di Firenze

²Dip. Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze

³Dip. Oncologia Medica Sandro Pitigliani, Osp. Prato, Ist. Toscano Tumori

Circulating Tumor Cells (CTCs) represent a "liquid biopsy of the tumor" which might allow real-time monitoring of cancer biology and therapies in individual patients. CTCs are extremely rare in the blood stream and their analysis is technically challenging.

The purpose of the study was to explore the feasibility of a protocol for the molecular characterization of single CTCs. CTCs were enriched and enumerated by CellSearch in blood samples collected from four metastatic breast cancer patients and subsequently isolated by DEPArray to obtain single CTCs to be submitted to Whole Genome Amplification. Samples (3-5 single CTC per patient) were analysed by NGS on the Ion Torrent system using the Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel (Thermo Scientific) able to investigate genomic "hot spot" regions of 50 oncogenes and tumor suppressor genes .

We found 57 sequence variants in 27 genes: 38 variants with possible deleterious consequences and 19 supposed benign variants on the basis of the Polyphen software. Twenty-eight mutations were already reported in the COSMIC/HGMD/dbSNP databases.

The gene with the highest number of sequence variants is TP53 (with 10 variants) followed by PDGFRA (5 variants) and KIT (4 variants).

We observed inter- and intra-patient heterogeneity in the mutational status of CTCs.

In 3 patients we could compare the NGS results from CTC with those from the primary tissue evidencing only few mutations in common between the two different compartments. The discordance between the mutational status of the primary tumor and CTCs suggests that CTCs in advanced stages may reflect the dynamic evolution of the disease more closely than the primary tumor.

This study demonstrates the feasibility of a non-invasive approach based on the liquid biopsy in metastatic breast cancer patients.

P002

QUALITY CONTROL (QC) FOR NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) LIBRARY: A RAPID AND USEFUL TOOL FOR DETECTION OF BRCA1/2 DELETERIOUS MUTATIONS

A. Costella, A. Minucci, R. Molinaro, D. Guarino, C. Santonocito, P. Concolino, E. Capoluongo

Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Sacred Heart, Rome, Italy

Introduction: Most reported germline BRCA1/BRCA2 deleterious mutations are small deletions, small insertions, nonsense mutations and splice variants, as described at Breast Cancer Information Core internet web site (BIC database). Recent advances in next generation sequencing (NGS) technology have enabled comprehensive and accurate screening of the entire genomic region of BRCA1/2 genes and, to date, many studies report the effectiveness and reliability of these technologies. We routinely perform BRCA genetic testing using the BRCA MASTR Dx assay (provided by Multiplicom) on the 454™ GS Junior platform (Roche Diagnostics). Here we show that Gene Scan (GS) labeling Quality Control (QC), performed before massive parallel pyrosequencing, coupled with Multiple Amplicon Quantification software (MAQ-S) analysis, is a rapid and powerful tool in the detection of deleterious BRCA mutations carried by different patients.

Methods: NGS libraries were prepared for 180 patients referred from the Service of Medical Oncology to our Diagnostic Molecular Unit. GS labeling QC assay was performed according manufacturers' instructions and MAQ-S software was employed for analysis results.

Results: GS labeling QC was able to detect 30 different BRCA frameshift mutations in our patients. In addition, 6 novel BRCA mutations (2 in BRCA1 gene and 4 in BRCA2 gene) were identified.

Conclusion: We prove that a simple QC step may represent a valid and useful tool for a rapid detection of frameshift mutations in BRCA genes. For this reason, we recommend to use this approach before massive parallel pyrosequencing.

P003

LARGE GENOMIC REARRANGEMENTS (LGRS) DETECTION FOR BRCA1/2 MUTATIONAL SCREENING: COMPARISON BETWEEN TWO ADVANCED TOOLS

P. Concolino, D. Guarino, C. Autilio, A. Minucci, C. Santonocito, A. Costella, E. Capoluongo

Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Sacred Heart, Rome, Italy

Introduction: About 5-10% of all breast cancers are estimated to be hereditary, and germline mutations in the tumor-suppressor genes BRCA1 (MIM#113705) and BRCA2 (MIM#600185) are found in a variable proportion of this group. Most of the reported BRCA1 and BRCA2 mutations are characterized by small deletions, small insertions, nonsense mutations and splice variants that result in a truncated protein. Nevertheless, an increasing number of large genomic rearrangements (LGRs), not detectable by current PCR-based methods, have been identified in these genes. Currently, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is the most commonly used technique for the detection of LGRs in the BRCA1/2 genes. However, a very fast assay, the BRCA1/2 MAQ (Multiplex Amplicon Quantification), has been recently developed by Multiplicom. The aim of this study was to compare the performance of the MAQ assay with MLPA, by using several positive BRCA1/2 LGRs DNA samples (previously tested by MLPA).

Methods: We selected 28 Italian patients previously referred from the Service of Medical Oncology to our Diagnostic Molecular Unit. Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples, eluted in 100 µl of Elution Buffer, quantified by spectrophotometer at 260 nm and stored at -20°C until use. Only DNA meeting specific qualitative requirements (OD 260/280 ratio ≥ 1.7 , concentration ≥ 15 ng/µl) were used in the study.

Results: MLPA test, used as first analysis level, identified 4 different BRCA1 and 1 BRCA2 LGRs in our patients. Negative results were obtained for all 16 wild-type DNA and for 7 pathological DNA, carrying small mutations, included in the study. These results were confirmed by MAQ technique. No false-positive or -negative results were obtained in independent repetitive experiments, which showed good reproducibility, both in MLPA and MAQ method.

Conclusion: We can affirm that MAQ, as well as MLPA technique, results to be a valid and reproducible tool for molecular diagnostics and we are confident that this assay can be used for BRCA1/2 mutational screening, as a fast and safe alternative to MLPA.

P004

PREANALYTICAL PHASE FOR MOLECULAR BIOLOGY TESTING: THE KEY ROLE OF CELLULARITY TO IMPROVE HARMONIZATION LEVEL OF TOTAL TESTING PROCESS

S. Donati, Z. Napoli, F. Santoni, R. Lari, L. Bianchi

U.O. Laboratorio Analisi, Ospedale S. Jacopo, Pistoia

Backgrounds and aims: In recent years RealTime PCR (RT-PCR) has emerged as a robust and widely used method also in diagnostic microbiology laboratories but the preanalytical phase is still not standardized enough. The main problem for molecular biology is the high heterogeneity of pre-treatment and extraction methods as well as samples used. Aim of this study was to standardize preanalytical phase: 1) defining sample suitability with a cellularity cut-off (CCO); 2) evaluating pretreatment and extraction methods efficacy with an internal control (IC) and an addition of bacterial strains (NCTC and ATCC) with known concentration.

Methods: Respiratory matrices (RM): 50 endotracheal aspirates (EA), 50 sputum samples (SS) and 50 bronchoalveolar lavages (BAL) was pre-treated with 3 methods: A-enzymatic digestion (ED) with proteinase K and lysozyme; B-mechanic lysis (ML) with TissueLyser (Qiagen) and centrifugation; C- only ML. 50 blood samples (BS) were extracted: D-with any pretreatment; E-after ED; F-after ML. All samples were extracted fully automated with QIASYMPHONY SP (Qiagen) and amplified with molecular tests: Cell-rGene (Biomérieux), *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* RealTime (Liveriver, DID). Statistical methods used were: mean, confidence interval 95% (CI 95%), chi-squared (χ^2).

Results: In MR method C showed: the lowest number (2% vs 15%) of inhibited samples; the higher extractive yield (+65% than A) as shown by cellularity/ml value; the lowest time (30 min vs 180 min); cellularity cut-off ($p < 0.01$) were respectively 10^6 cell/ml for EA and SS and 2×10^5 cell/ml for BAL. 7%, 25% and 6% of EA, BAL and SS were respectively not suitable samples. For BS the higher extractive yield resulted with F pretreatment (+ 15% than D and E). RT-PCR methods sensitivity was respectively 50-150 Colony Forming Unit (CFU)/ml in RM and 20-100 CFU/ml in BS.

Conclusions: Preanalytical phase, in microbiology, has a key role in molecular diagnostic and needs to be standardized to improve harmonization level of total testing process. CCO and the evaluation of inhibitors increase negative predictive value reducing false negative results. Including suitability automated parameters, like CCO, we can standardize the high analytical variability due to biological matrices heterogeneity.

P005

NOVEL BRCA1 AND BRCA2 GERMLINE MUTATIONS IN ITALIAN BREAST AND/OR OVARIAN CANCER FAMILIES

D. Guarino, C. Santonocito, A. Minucci, P. Concolino, A. Costella, R. Molinaro, E. Capoluongo

Laboratory of Clinical Molecular Biology, Department of Biochemistry & Clinical Biochemistry, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

Breast and ovarian cancer (BC/OC) is a multifactorial disease caused by interaction of genetic and non-genetic factors and characterized by a predisposition to inheritance; it has been estimated that 5-10% of these are hereditary and in this context BRCA1 and BRCA2 are the most important genes. Individuals carrying pathogenic mutations in these genes show an increased lifetime risk of developing BC/OC. The rate of mutation in Italian BC/OC families ranges from 8 to 37%. The mutational spectrum include point mutations, insertions/deletions, genomic rearrangements and many variants of unknown clinical significance (UVs). The aim of this study is to described novel germline mutations and UVs of BRCA1/BRCA2 genes in Italian Central-South patients affected by breast/ovarian cancer. We enrolled 307 consecutive Caucasian subjects aged 21-70 years. Genomic DNA was extracted from whole blood sample and molecular analysis of BRCA1/2 genes was performed by Next Generation Sequencing complete pipeline. Potential structural and functional effects of missense variants were predicted using PolyPhen and SIFT. We have screened 103 probands belonging to high risk- families identifying both known mutations and variants not reported in the main database or in the literature. In particular we found 11 mutations (5 in BRCA1 and 6 in BRCA2), and 7 UVs (4 in BRCA1 and 3 in BRCA2). About UVs, In silico analysis results showed that 2 were indicated as tolerated/benign, 2 as possibly damaging and 2 as deleterious/possibly damaging while for one variant there were conflicting data (damaging/benign). Since all these variants were also absent in 100 chromosomes from a control population, we suspect that 16 of these variants might represent novel pathogenic mutations, above all because they were carried by individuals with an assessed risk. Segregation analysis in the eventually affected family members could help the definition of biological significance of these variants in the future, through a careful monitoring of patients resulting positive for the same variants. The knowledge of the spectrum of mutations and their geographical distribution could provide more efficient approach for screening protocols being NGS-strategy more rapid, sensitive and less expensive.

S. Levanat. Three novel BRCA1/BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer families in Croatia. *Gene* 2012;498:169-76.

P006

SCREENING OF AFFECTED INDIVIDUALS BY FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA BASED ON MASSIVE PARALLEL SEQUENCING (MPS): A PRELIMINARY REPORT

M. De Bonis, A. Minucci, G. Canu, E. Capoluongo

Laboratory of Clinical Molecular Diagnostics and Personalized Medicine, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Rome, Italy

Introduction: Individuals with Familial Hypercholesterolemia (FH) are at high risk of premature coronary artery disease, due to lifetime exposure to high levels of circulating Low Density Lipoprotein Cholesterol (LDLC). Indeed, FH is a common disorder associated with early coronary heart disease that can be treated by cholesterol-lowering drugs. Mutations in the LDL receptor (LDLR) gene, which is responsible for the cellular uptake of LDLC, are the most common cause of FH. Mutations in the apolipoprotein B and E (APOB-E) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) genes have also been described. In this study, we combined clinical selection of hypercholesterolemic patients and MPS in order to setup a molecular diagnostics pipeline for the screening of FH affected individuals.

Methods: DNA was obtained from 10 individuals with total cholesterol >230 mg/dl. MPS was performed on 454 GS Junior (Roche) using ADH MASTR kit (Multiplicom) able to detect mutations in the coding and promoter regions of LDLR, PCSK9, APOE and part of the exon 26 of APOB genes. Data analysis was performed using "ad hoc" bioinformatics tool developed in our laboratory.

Results: Pathogenic mutations were found in 3 patients (30%). Mutations identified were: p.D221G in exon 4 of LDLR, p.K3449E in exon 26 of APOB (that is a novel mutation, because not previously reported in literature) and, finally, p.L21_L22ins2L in exon 1 of PCSK9. One patient was found carrier of p.A391T, p.R3638Q, p.C130E and p.L21_L22ins2L variants in LDLR, APOB, APOE and PCSK9 genes, respectively.

Discussion: In this study, with a single 454 GS Junior run, ADH MASTR kit allowed a definitive FH molecular diagnostic screening in 4 hypercholesterolemic patients. We underline that the lower cost and workload associated with MPS-based testing may increase access to this type of test above all in the context of population screenings. Finally, in presence of a precisely identified gene defect, targeted pharmacologic therapies, as PCSK-9-inhibitors (MTP-inhibitor lomitapide) and the ApoB synthesis inhibitor (mipomersen) can be used.

P007

FREQUENCIES OF THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE MUTATIONS IN THE ITALIAN POPULATION AND EVALUATION OF THE DIAGNOSTIC MOLECULAR WORKFLOW AT THE GEMELLI HOSPITAL

M. De Bonis, E. De Paolis, A. Minucci, G. Canu, E. Capoluongo

Laboratory of Clinical Molecular and Personalized Diagnostics, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University, Rome, Italy

Introduction: G6PD-deficiency is a X-linked disorder affecting more males than females; its prevalence varies among populations and it is common in Mediterranean areas, including Italy. The aim of this study was to evaluate the G6PD mutation frequency in Italian subjects originating from different areas of the country. We also evaluated the diagnostic workflow routinely employed for the detection of G6PD mutations.

Method: We considered every G6PD-deficient individual addressed to our laboratory since 2010 that was further screened with molecular test. For molecular diagnosis, we use two analytical steps. The first level, focused on screening of the most common mutations in Central Italy (G6PD Mediterranean, Seattle, A-, Cassano and Chatam) is based on RFLP; the second level is based on direct sequencing of the promoter, coding and about 80% non-coding regions of the G6PD gene. We examined N= 450 G6PD-D subjects (220 males and 230 female).

Results: Our molecular screening revealed genetic defects in the coding G6PD gene in all patients with low residual enzymatic activity, proving a high correlation between mutation type and enzymatic activity. DNA profiling on the first level showed: the G6PD Mediterranean genotype in 318 subjects (71%), Seattle in 41 (9%), A- in 32 (7%), Cassano in 14 (3%) and Chatam in 25 (6%). The Sanger sequencing identified 19 patients (4%) with rare variants: Union (4), Rignano (1), Palestrina (1), Costanzo (1), Beverly Hills (1), Orissa (1), Konan (1), Kambos (1), Salerno (3), Murcia (1), Santa Maria (2) and Santiago de Cuba (1). The detection rate of the first level analysis of G6PD molecular test is about 96%.

Discussion: Our approach for G6PD molecular screening showed a high detection rate and in only few cases we used Sanger sequencing to obtain a definitive molecular diagnosis, underlining as RFLP assay could successfully identify more than 90% of overall mutated patients above all when the screening is focused on a specific geographic area. This study reported that the G6PD Mediterranean genotype is the most frequent variant in Italy. The inclusion of G6PD Union mutation (27% of rare mutations) within the first level increased the detection rate to only 97%: so it seems to be not useful in our workflow.

Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, et al. *Blood Cells Mol Dis* 2012;48:154-65.

P008

CANCER-RELATED GENES PANEL SCREENING IN WOMEN AFFECTED BY BREAST CANCER THROUGH A COUPLED NGS-MICRODROPLET PCR APPROACH

M. Nunziato¹, M.V. Esposito², M.A. Diroma², A. Telese², A. Calabrese³, M. D'Aiuto⁴, V. D'Argenio⁵, F. Salvatore⁶

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples. Dept. of Sport Sciences, University Parthenope, Naples, Italy

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

³CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples. Dept. of Senology, Istituto Nazionale Tumori – IRCCS Fondazione Pascale, Naples, Italy

⁴Dept. of Senology, Istituto Nazionale Tumori – IRCCS Fondazione Pascale, Naples, Italy

⁵CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples. Dept. of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University Federico II, Naples, Italy

⁶CEINGE-Biotecnologie Avanzate. Dept. of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University Federico II. IRCCS-Fondazione SDN, Naples, Italy

Breast cancer (BC) is the most common malignancy in females. About 10% of all BCs are familial, "Hereditary breast and ovarian cancers (HBOCs)", and can be related to a germline predisposing-mutation in high penetrant genes, namely BRCA1 and BRCA2. Despite BRCA1 and BRCA2 confer a high susceptibility to HBOC, only a small fraction of patients carry mutations in these genes; it has been supposed that familial BC may be caused by germline mutations in other high, moderate, and low penetrance cancer genes. In order to identify BC predisposing mutations in high-risk families, we designed a panel of 84 cancer related genes, including BRCA1/2. For each selected gene, we included all coding regions, 100 bp in the intronic boundaries, the promoter and the 3' UTR, obtaining a total target size of about 1Mb. Twenty-four patients, tested for BRCA1/2 mutation status as previously described (D'Argenio 2015), were enrolled in the present study. Libraries were prepared using the Thunderstorm System (RainDance Technologies) and sequenced with the Illumina MiSeq System. Data analysis was carried out by a 6-step "in-house" computational pipeline. We obtained ~80% of filtered high quality reads/sample. The mean sample coverage ranged from 24.0 to 213.1. We found 2,138 out of 2,975 SNPs and 524 out of 797 indels after variant filtration at a minimum variant depth of 10. >50% of SNPs were missense mutations. A large fraction of both SNPs (37.0%) and indels (37.6%) was also identified within introns. A significant amount of known variants identified within samples were annotated using SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net/>) software and dbNSFP databases (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>) to improve variant evaluation. Further analysis to identify possible causative mutations are in progress. The implementation of this second level molecular screening in a routine diagnostic workflow will increase diagnostic sensitivity and lead to a better patients and families cancer risk assessment. In addition, this method could lead to the identification of other BC-related genes improving our knowledge about HBOC genetics.

P009

COMPARISON OF DIFFERENT APPROACHES FOR THE PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS OF CYSTIC FIBROSIS

F. Cariatì², F. Salvatore¹, R. Tomaiuolo¹

¹*Ceinge Biotecnologie Avanzate scrl and Dip. Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples*

²*Ceinge Biotecnologie Avanzate scrl, Naples*

Background: Whole Genome Amplification (WGA) technologies generates many copies of genomic DNA from limited amounts of starting material for both genomic screenings (i.e., CGH array, Next Generation Sequencing) and for molecular diagnosis of specific disorders even from a single cell. This enrichment should introduce the minimal amount of representational bias; however, WGA methods are in general prone to amplification bias that is usually dependent from the specific WGA method. Therefore the choice of the WGA method can be relevant for the detection of specific genetic variations. For the optimization of preimplantation diagnosis of Cystic Fibrosis, we have performed a comparative evaluation of different methods: two WGA technologies and an alkaline lysis directly followed by PCR.

Material and Methods: Samples of genomic DNA and single lymphocyte from two mock families were used in the study. Single lymphocytes were used for PGD validation. Following the current European guidelines, we performed linkage analysis: the genomic DNA was analyzed by multiplex PCR for sets of 4 intragenic and extragenic short tandem repeats (STR) markers closely linked to the CFTR gene. Ampli1, Sureplex (WGA kits) and alkaline lysis were tested in single cell followed by multiplex PCR and capillary electrophoresis.

Results: For single cell testing, Ampli1-based WGA resulted in successful duplex PCRs both in term of efficiency and absence of allele drop-out (ADO). PCR amplification performed after Sureplex WGAs were not successful after multiple attempts. Multiplex PCR from DNA obtained after alkaline lysis showed heteroduplexes without ADO.

Conclusion: The study presents a reproducible and robust method for PGD of CF that can be associated with different sample DNA extraction and/or preamplification protocols such as WGA and alkaline lysis. Our results indicate that the preparation time and costs are minimized using alkaline lysis. However, optimization of WGA methods applicable to PGD of multiple diseases and concurrent detection of aneuploidies is of paramount relevance to exclude the occurrence of genetic alterations in implanted embryos and consequently increase the efficacy of in vitro fertilization procedures.

Granted from DIAINTECH-Regione Campania (to F.S.); SIBioC (to R.T.).

Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, et al. Hum Reprod 2011;26:33-40.

P010

DETECTION OF ACTIVATING ESTROGEN RECEPTOR 1 (ESR1) MUTATIONS IN SINGLE CIRCULATING TUMOR CELLS

C. Paolillo¹, Z. Mu², L. Austin², T. Nguyen², P. Fortina², M. Cristofanilli², E. Capoluongo¹

¹*Lab. di Biochimica e Biologia Molecolare clinica, Uni. Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

²*Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia*

Background: Approximately 65% of primary breast cancers express the estrogen receptor α (ER α), and the mainstay of treatment are therapies that result in selective estrogen receptor modulation or estrogen deprivation (aromatase inhibitors). Even though endocrine therapy (ET) results in reduced recurrence and mortality, a significant portion of patients relapse and develop ET resistance. Recent evidence has shown that activating hot-spot mutations in the ligand-binding domain of the ER α acquired during treatment (frequency of 20%) can drive resistance to ET. Circulating tumor cells (CTCs) provide a non-invasive accessible source and the molecular profiling of these rare cells might lead to insight into disease progression and therapeutic strategies.

Purpose: Investigate the incidence and heterogeneity of ESR1 mutational status within single CTCs isolated from individual metastatic breast cancer patients (mBCs).

Methods: CTCs were enriched and enumerated by CellSearch® in 7.5 ml blood samples collected from 21 mBCs according to standard protocol. Each CTC-enriched sample with at least 20 CTCs was loaded into the DEPArray™ A300K chip, and chip scanning was performed according to standard protocol. Recovered cells were subdivided in 3 different groups: ER positive (ER+: Dapi+, ER+, CK+, CD45-); ER negative (ER-: Dapi+, ER-, CK+, CD45-) and white blood cells (WBCs) (Dapi+, ER-, CK-, CD45+) which then were submitted to whole genome amplification using the MALBAC protocol. Detection of the 14 known ESR1 hot spot mutations was performed by targeted Sanger sequencing.

Results: A total of 65 cells were recovered from 3 mBCs, and ESR1 mutational status was performed on 25 cells (11 ER+, 6 ER- and 8 WBCs). The hot spot mutation Y537S was found in all 5 ER+ cells derived from 1 of the 3 patients who failed 2 lines of chemotherapy and previous single-agent ET. Four of the 5 ER+ cells were heterozygous for the Y537S while one cell appeared homozygous, possibly due to loss of heterozygosity. No mutations were reported in all the other cells analyzed.

Conclusions: Evaluation of ER status and early identification of ESR1 mutation in ER+ CTCs may allow prediction of ET success and need for switching to other treatments before progression of metastatic disease.

P011

IMPROVED MASSIVE PARALLEL SEQUENCING STRATEGY FOR ROUTINE MOLECULAR DAGNOSIS OF BRCA GENES

G.L. Scaglione, A. Costella, D. Guarino, C. Santonocito, P. Concolino, A. Minucci, E. Capoluongo

Laboratory of Clinical Molecular and Personalized Diagnostics, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University, Rome, Italy

Background: Since the identification of germline BRCA mutations can be useful both for prophylactic strategies and for therapy administration, BRCA1 and BRCA2 are among the most frequently genes analyzed. Molecular diagnostics approaches must guarantee high quality molecular testing, able to detect both qualitative and quantitative changes in BRCA-genes status. Sanger sequencing is actually the gold standard to identify qualitative changes in BRCA sequence: nevertheless, it is time consuming and expensive.

Aim: To tackle the growing needs in BRCA testing workload, we investigated the feasibility of a scale-up strategy by means of MPS technologies applied to clinical diagnostic routine. Standard 454 pyrosequencing protocol was set up to achieve an increasing number of patients (up to 13) per run averting amplicon coverage reads loss. Methods: A total of 23 runs were assayed to complete BRCA1/2 screening in 220 subjects. To assess the performance, accuracy and safety of sample scale up strategy using BRCA-MASTR v2.2 kit (Multiplicom) on GS Junior 454 (Roche) platform, bioinformatics data were collected and analyzed using a novel analysis software Amplicon Suite. Run parameters and patients data were deeply investigated from 15 runs of 8 samples, 1 run of 11, 2 runs of 12 and finally 5 runs of 13 sample/run. Descriptive statistics and confidence intervals (IC99%) for the read coverage were calculated for all the sample, plex and single amplicon in each of the 4 different type of run. Results: All different type of run reached the quality criteria also after increasing the number of patients in each batch. Thus, using the standardized final concentration of DNA (1×10^6 molecules/uL) for each patient, the performance of run was not significantly affected in terms of total reads and coverage. Target minimum read coverage was not dependent on the samples/run ratio: 13 samples/run seemed to guarantee a lower percentage of target reads with coverage loss.

Conclusion: This work is a proof-of-principle that is aimed to extend the overall capacity of short/middle time frame needs encountered in genetic testing for cancer therapy management. Finally, bioinformatics strategies applied to library and chemistries datasets could ameliorate MPS dynamics for clinical laboratories.

J Surg Oncol 2012;105:444-51. doi: 10.1002/jso.21856.

P012

LIMITI DELL'INDAGINE BIOCHIMICA NELL'IDENTIFICAZIONE DEL PORTATORE DEL TRAIT TALASSEMICO

D. Dell'Edera, M. Leo, A. Allegretti, C. Santacesarea, B.C. Cicchetti, M. Pilato, A.A. Epifania

UOD di Citogenetica e Genetica Molecolare, Osp. Madonna delle Grazie, Matera

Su richiesta ginecologica è pervenuta alla nostra osservazione una donna di 25 anni (signora Ro.Ro), gravida alla 12^a settimana, per sottoporsi al bitest. Dall'anamnesi effettuata alla coppia, si desumeva che la signora era portatrice del tratto beta talassemico (eritrociti: 5.12×10^6 /ul, MCV: 67 fl, MCH: 21,5 pg, HbA2: 4,0%, HbF: 1,5). Al contrario il marito mostrava un quadro ematologico che poteva essere associato al trait alfa talassemico (eritrociti: 6×10^6 /ul, MCV: 76.8 fl, MCH: 25.2 pg, HbA2: 2.2%, HbF: 0,6%).

L'analisi molecolare dei geni beta globinici effettuata sulla signora ha messo in evidenza la mutazione IVS1.6 T>C in eterozigosi. Lo studio molecolare dei geni alfa globinici ha accertato che il marito presentava la mutazione $\alpha 2$ IVS1[-5nt] in eterozigosi che determina la perdita di un gene α ed un fenotipo $\alpha+$ (α -/ $\alpha\alpha$) detto anche $\alpha 2$ Tal.

Dall'anamnesi familiare della signora risulta che la madre presentava un quadro ematologico compatibile con il trait alfa talassemico e non beta talassemico come presente nel padre. Per escludere che la signora Ro.Ro. avesse ereditato anche il trait alfa talassemico abbiamo eseguito lo studio molecolare dei geni alfa globinici. Questo studio ha confermato la presenza della mutazione $-\alpha^{3,7}$ in eterozigosi. Quindi la signora Ro.Ro. risulta essere portatrice sana sia del trait alfa e sia del trait beta talassemico.

Il caso da noi descritto dimostra come, di fronte a soggetti $\alpha 2$ TAL, il solo screening biochimico risulta insufficiente. Da ciò scaturisce che è indispensabile una esatta individuazione del portatore sano, con successiva indagine approfondita nei riguardi dei consanguinei e del coniuge. Nel nostro caso una attenta anamnesi familiare e il successivo studio molecolare dei geni alfa e beta globinici ha permesso prima di tutto di porre una corretta diagnosi circa l'assetto genetico dei geni alfa e beta globinici ed in secondo luogo ha permesso di individuare coppie a rischio di concepire figli con talassemia $\alpha 1$ TAL i quali presenteranno un quadro ematologico caratterizzato da anemia, microcitosi e ipocromia di grado lieve. Questa condizione è spesso scambiata con anemia sideropenia e trattata in modo inappropriato con terapia marziale.

P013

MIR-199A AND MIR-125B EXPRESSION LEVELS IN SERUM OF PATIENTS AFFECTED BY OVARIAN CANCER

M. Benati¹, M. Montagnana¹, E. Danese¹, M. Perfranceschi¹, S. Giudici², M. Franchi², G. Lippi³, G.C. Guidi¹

¹Dep. of Life and Reproduction Sciences, Clinical Biochemistry Section, University of Verona, Verona, Italy

²Dep. of Life and Reproduction Sciences, Obstetrics and Gynaecology Section, University of Verona, Verona, Italy

³Lab. of Clinical Chemistry and Hematology, Academic Hospital of Parma, Parma, Italy

Aim: Recent studies show that miRNAs are involved in cancer, by regulating cell proliferation, apoptosis and angiogenesis. Accordingly, their deregulation could contribute to cancer development and progression. It has been demonstrated that ovarian tissues over-expression of miR-199a and miR-125b inhibits tumor angiogenesis, a fundamental process for the cancer development and growth. Aims of our study were to investigate the expression levels of miR-199a and miR-125b in serum of ovarian cancer patients and to evaluate the correlation between miRNAs expression and traditional biomarkers (CA125 and HE4).

Methods: 34 epithelial ovarian cancer (EOC) patients (53±15 years) and 31 healthy controls (55±17 years) were enrolled. Serum samples were collected prior to definitive surgical management and RNA extraction was performed by using the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). miR-199a and miR-125b expression was determined by quantitative RT-PCR (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, California). The expression levels of miRNAs were normalized to miR-16 and calculated utilizing the 2^{-#Ct} method. Differences between groups were evaluated by Mann-Whitney test and correlations were tested by Spearman's test.

Results: We observed a statistically significant down-regulation of serum miR-199a expression in EOC patients compared to controls (p=0.005). Contrarily, no statistically significant difference was observed for miR-125b (p=0.054). A positive correlation was found between miR-199a and miR-125b expression (r=0.33, p=0.007). Moreover, miR-199a and miR-125b expression resulted significantly correlated with CA125 concentrations (r=0.25, p=0.046 and r=0.31, p=0.012 respectively), but not with HE4 levels (r=0.09, p=0.47 and r=0.23, p=0.07 respectively).

Conclusion: As previously observed in ovarian cancer tissue, serum miR-199a levels result down-regulated in patients affected by ovarian cancer. Accordingly, circulating miRNAs have great potential to serve as non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers with the ability to monitor real-time tumor dynamics.

He J, Jing Y, Li W, et al. Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. PLoS One 2013;8:e56647.

P014

ABERRANT miRNAs EXPRESSION IN PATIENTS AFFECTED BY ENDOMETRIAL CANCER

M. Montagnana¹, M. Benati¹, E. Danese¹, M. Perfranceschi¹, S. Giudici², M. Franchi², G. Lippi³, G.C. Guidi¹

¹Dep. of Life and Reproduction Sciences, Clinical Biochemistry Section, University of Verona, Verona, Italy

²Dep. of Life and Reproduction Sciences, Obstetrics and Gynaecology Section, University of Verona, Verona, Italy

³Lab. of Clinical Chemistry and Hematology, Academic Hospital of Parma, Parma, Italy

Aim: In developed countries endometrial carcinoma (EC) is the commonest gynecological cancer. To date, no specific serum tumor markers result satisfactorily efficient to diagnose or monitor EC. Aberrant tissue miRNA expression has been reported in EC. Recently, circulating extracellular miRNAs have been identified and suggested as non-invasive biomarkers of gynecological diseases. Aim of our study was to investigate the differential expression of four serum miRNAs (miR-222, miR-223, miR-186 and miR-204) in EC patients in comparison to healthy subjects.

Methods: 46 consecutive women affected by endometrioid EC were included and blood samples collected prior to any therapeutic procedures. Cases were compared to 28 matched healthy controls without a history of cancer or other diseases. Total RNA, including miRNAs and other small RNA molecules, was isolated from 625 µl of serum using the Ambion mirVana PARIS Kit (Foster City, CA, USA). The TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) on an ABI 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) to verify differential miRNAs expression. All assays were performed in triplicate. The relative expression levels of miRNAs were normalized to miR-16 and were calculated utilizing the 2^{-#Ct} method. Differences between groups were evaluated by Mann-Whitney test and correlations were tested by Spearman's test. For each miRNA, we constructed the ROC curve and calculated the area under the ROC curve (AUC).

Results: Serum levels of miR-186, miR-222 and miR-223 resulted significantly up-regulated in patients respect to controls (p=0.004, p=0.002 and p <0.0001). Contrarily, miR-204 resulted significantly down-regulated in patients (p <0.0001). A positive significant correlation was observed between miR-186 and both miR-222 (r=0.71, p <0.0001) and miR-223 (r=0.64, p <0.0001) as well also between miR-222 and miR-223 (r=0.57, p <0.0001). The AUCs for the selected miRNAs ranged from 0.70 to 0.87, significantly higher than for CA125 (0.59).

Conclusion: Our results confirm that these miRNAs are implicated in EC and hold promise as a novel blood-based biomarker for the diagnosis.

Wang L, Chen YJ, Xu K, et al. Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma. PLoS One 2014;9:e110767.

P015

VALUTAZIONE DEL PCA3 NELLA DIAGNOSI DEL CARCINOMA PROSTATICOA.R. Bruno¹, F. Mellone¹, A. Ferramosca²¹Lab. di Patologia Clinica, U.O.S. Biologia Molecolare, P.O. "Santa Caterina Novella", Galatina (LE)²Lab. Biochimica, Università del Salento, DiSTeBA - Lecce

Il Ca prostatico risulta essere una delle neoplasie più frequenti nel maschio adulto ed è al secondo posto tra le cause di morte in molti paesi occidentali. Come test di screening di primo livello si valutano i livelli di PSA, ma la bassa specificità del PSA ha spinto i ricercatori verso la scoperta di nuovi marker molecolari, tra questi il PCA3. Il PCA3 è un test genetico che valuta l'espressione del gene DDR3. In questo lavoro abbiamo valutato la sensibilità e la specificità del nuovo marcatore PCA3 confrontandolo con i livelli di PSA per una corretta valutazione del carcinoma prostatico. A tal fine sono stati analizzati 104 campioni di urina provenienti da pazienti con PSA sospetto e una biopsia negativa. Il test del PCA3 ha dato esito positivo in 28 casi e esito negativo in 76. Abbiamo valutato poi la concentrazione del PSA sia nei soggetti risultati positivi al PCA3 test sia nei soggetti risultati negativi. La concentrazione di PSA è stata divisa in 3 range (< di 4, 4<x>10 e >10 ng/ml). Dall'esame delle percentuali si è potuto osservare che le diverse classi non mostravano variazioni significative tra soggetti positivi e negativi e il range più rappresentato risultava essere in entrambi i casi quello del PSA compreso tra 4 e 10 ng/ml. Partendo da queste considerazioni abbiamo focalizzato l'attenzione sull'efficacia diagnostica del PCA3 score analizzando il decorso dei pazienti risultati positivi al PCA3 test di questi: un 30% ha avuto esito positivo alla biopsia, un 30% ha avuto esito negativo alla biopsia, il 18% non ha eseguito alcun esame diagnostico e il restante 22% si è sottoposto ad altri esami di screening. I soggetti con esito positivo alla biopsia avevano PSA superiore a 10 ng/ml e PCA3 score di gran lunga maggiore di 35. I pazienti con esito negativo avevano invece valori di PSA compresi tra 4 e 10 ng/ml e valori di PCA3 score leggermente aumentati ma comunque inferiori a 60. Abbiamo potuto concludere quindi che il PCA3 test ha specificità maggiore e sensibilità minore del PSA, quindi il PCA3 potrebbe essere un buon marcatore complementare al PSA in quanto ne migliora la specificità. Avevamo notato infatti che i valori di PSA non erano in grado di distinguere in maniera significativa i casi di carcinoma.

P016

MYOCARDIAL EXPRESSION ANALYSIS OF OSTEOPOINTIN AND ITS SPLICE VARIANTS IN PATIENTS AFFECTED BY END-STAGE IDIOPATHIC OR ISCHEMIC DILATED CARDIOMYOPATHYM. Cabiati¹, B. Svezia², L. Botta³, C. Caselli¹, A. Pucci⁴, M. Matteucci², V. Lionetti², S. Del Ry¹¹CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy²Institute of Life Sciences, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy³Dept. of cardiac Surgery, Niguarda Ca' Granda Hospital, Milan, Italy⁴Histopathology Dept., University Hospital, Pisa, Italy

Background: The morphological and molecular features of cardiac remodelling are similar in idiopathic (DCM) as well as ischemic (ICM) human end-stage cardiomyopathy. However, the hallmarks of cardiac remodelling typical of DCM may be helpful to identify new treatment targets. Osteopontin (OPN), a phosphoglycoprotein of cardiac extracellular matrix, is an emerging mediator of cardiac inflammation and fibrosis in failing hearts. We investigated the OPN isoforms and thrombin myocardial profile in end-stage idiopathic (DCM) or ischemic (ICM) dilated cardiomyopathy patients.

Methods: LV samples from failing DCM (n=8; LVEF%=17.5±3; LVEDV=305.5±110 ml) and ICM patients (n=8; LVEF%=19.5±5.2; LVEDV=270±97 ml) undergoing cardiac transplantation were collected. As control (C), atrial samples of normal subjects (LVEF% ≥50) were analyzed. Real-time PCR analysis (CFX-96 Real-Time PCR detection systems, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was carried out to measure OPN-a, OPN-b, OPN-c and thrombin mRNA profile and data were normalized to three genes (RPS4X, eEF1a, RPL13a). The protein levels of OPN-a were assessed by enzyme immunometric assay. Results: Even though the extent of interstitial fibrosis in ICM was higher than DCM, OPN-a mRNA was found significantly higher in DCM with respect to C and ICM patients (C: 2.2±0.3; DCM: 31.3±7.4; ICM: 2.7±1.1, p=0.0004 C vs DCM and p=0.0002 DCM vs ICM). A similar trend was observed for OPN-a cardiac protein concentration (C: 1.127±0.26; DCM: 1.29±0.22; ICM: 1.00±0.077 ng/ml). The thrombin mRNA resulted: C: 0.13±0.02; DCM: 19.1±4.9; ICM: 5.4±2.2, p=0.001 C vs DCM and p=0.007 DCM vs ICM. A positive correlation between OPN-a and thrombin was also observed (r=0.6; p=0.007). The OPN splice variants mRNA expression, OPN-b and OPN-c, were detectable only in ICM patients (OPN-b: 0.357±0.273; OPN-c: 0.091±0.033) and not in DCM patients.

Conclusion: OPN-a and thrombin mRNA expression resulted dependent on the origin of heart failure. For the first time, we evaluated the OPN splice variants, OPN-b and OPN-c, in cardiac tissue with failing disease highlighting a different transcriptomic profile for DCM and ICM patients. The result of our study might suggest that OPN-b and OPN-c expression is correlated with different clinical-pathological outcomes.

P017

TRANSCRIPTOME PROFILING OF NATRIURETIC PEPTIDE SYSTEM IN CARDIAC TISSUE OF PATIENTS WITH IDIOPATHIC OR ISCHEMIC END-STAGE DILATED CARDIOMYOPATHY

M. Cabiati¹, B. Svezia², M.M. Cesare¹, L. Botta³, C. Caselli¹, M. Matteucci², V. Lionetti², S. Del Ry¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa Italy

²Institute of Life Sciences, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

³Department of cardiac Surgery, Niguarda Ca' Granda Hospital, Milan, Italy

Background: Circulating levels of Natriuretic Peptides (NPs) play a role as reliable biomarkers of disease stage in patients with heart failure (HF). However, while several studies are present in literature about their circulating levels, only few data on the RNA expression have been reported and it is still debated whether the myocardial levels of NPs change in relation to etiology of cardiomyopathy in patients with similar left ventricular (LV) function. The aim of the study was to analyze the transcriptome profiling of NPs system in LV tissue of patients affected by idiopathic (DCM) or ischemic (ICM) end-stage dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation.

Methods: Transcriptomic profile of NP system and of relative reference genes (RPS4X, eEF1a, RPL13a) was measured in LV myocardium of DCM (n=8; LVEF%=17.5±3; LVEDV=305.5±110 ml) and ICM pts (n=8; LVEF%=19.5±5.2; LVEDV=270±97 ml) with similar cardiac function by Real-Time PCR analysis (CFX-96 Real-Time PCR detection systems, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As control (C, n=5) atrial cardiac tissue samples of subjects with LVEF% ≥50 were analyzed.

Results: All myocardial NPs resulted expressed in both DCM and ICM patients, yet BNP was the main expressed NP. In particular, ANP (DCM: 0.445±0.26; ICM: 0.077±0.05) and BNP (DCM: 9.89±1.92; ICM: 3.29±1.4, p=0.007) resulted higher in DCM compared to ICM, while CNP was more higher in ICM, even though not significantly (DCM: 0.864±0.4; ICM: 1.85±0.99). All NP receptors were expressed in both groups. Even though BNP and CNP levels were higher in both failing hearts compared to C, between the NP receptors only NPR-B resulted increased in DCM (p <0.0001 C vs. DCM). Significant correlations were observed between BNP and NPR-A, NPR-B and NPR-C (p=0.022 and p=0.044, p <0.0001 respectively).

Conclusions: Our results show, in the presence of similar decay of the LV function, an activation of the entire NP system reporting a different involvement in cardiac tissue of ICM/DCM patients and underlining a different trend for CNP mRNA expression. Even though more studies are necessary to better explain the role of CNP in the setting of cardiomyopathies, these findings support the future use of CNP as a new target in the treatment of ischemic disorders, thanks to its protective effects.

P018

ADENOSINE RECEPTORS TRANSCRIPTOMIC PROFILING IN LEUKOCYTES AND CARDIAC FIBROBLAST OF PATIENTS WITH VALVULAR DISEASE UNDERGOING PROSTHETIC IMPLANTATION

M. Cabiati¹, V. Della Latta², S. Zimbone³, M.R. Natale³, D. Gentile³, F. Diciolla⁴, P. Capecci³, F. Laghi-Pasini⁴, M.A. Morales¹, S. Del Ry¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, CNR, Italy

²University of Siena, Italy

³Department of Medical Sciences, Surgery and Neurosciences, University of Siena, Siena, Italy

⁴Department of Heart, Vessels and Thorax, University Hospital of Siena, Siena, Italy

⁵*contributed equally to this paper

Background: Adenosine restores tissue homeostasis through the interaction with its G-protein coupled membrane receptors (A1R, A2aR, A2bR and A3R), all with a cardioprotective role. ARs are expressed on multiple cardiac cells, including fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells and leukocytes however the modulation of these receptors is still not fully understood. Aim of this study was to assess changes of transcriptomic profiling of A1R, A2aR, A2bR and A3R in human leukocytes of patients with HF due to valvular disease (HF-V) as compared to healthy subjects (C) and in cardiac fibroblast (CF) obtained by auricle fragments of patients undergoing cardiac surgery for prosthetic implantation. A human CF atrial cell line (NHCF-A) was used as control (cc).

Methods: Total RNA was extracted from leukocytes of C (n=7) and of HF-V (n=6, NYHA III-IV) with PAXgene Blood RNA Kit and by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform from CF (n=13). ARs, CD39 and CD73 mRNA expression was evaluated by Real-time PCR (CFX-96 Real-Time PCR detection systems, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Results: Higher levels of ARs mRNA expression were observed in HF-V pts with respect to C both at peripheral and cardiac level: Leukocytes A1R: C=1.97±0.72, HF-V=10.9±3.27, p=0.0098; A2aR: C=0.45±0.15, HF-V=3.19±0.94, p=0.0057; A2bR: C=0.43±0.16, HF-V=5.00±2.98, p=0.05; A3R: C=1.39±0.26, HF-V=2.9±0.71, p=0.04; CD39: C=0.33±0.05, HF-V=2.37±0.40 p <0.0001; CD73: C=1.34±0.38, HF-V=6.77±1.91, p=0.01. CF A1R: cc=0.33±0.004, CF=4.24±1.72; A2aR: cc=1.01±0.006, CF=2.77±0.67; A2bR: cc=0.07±0.03, CF=3.04±1.3; A3R: cc=0.74±0.26, CF=2.9±0.71, p=0.04; CD39 cc=0.66±0.002 CF=9.6±3.06; CD73: cc=0.32±0.01, CF=4.71±2.22. In the subgroup of patients (n=4) in which simultaneous cardiac biopsy and blood sample were obtained, AR leukocytes transcriptomic profile mimed that of CF showing the previously reported trend.

Conclusions: These results demonstrated that all ARs are activated both in peripheral leukocytes and at tissue cardiac level in HF-V pts showing, for the first time, that human circulating blood cells may express the same alterations occurring in the heart.

P019

PROSPECTIVE EVALUATION OF RASSF1A CELL-FREE DNA AS A BIOMARKER OF PRE-ECLAMPSIA.

F. Salvianti¹, S. Galbiati², A. Inversetti³, M. Smid³, L. Valsecchi³, M. Candiani³, L. Cremonesi², M. Ferrari², M. Pazzagli¹, P. Pinzani¹

¹Dept. Clinical, Experimental and Biomedical Sciences, University of Florence, Italy

²Unit of Genomic for the Diagnosis of Human Pathologies, Division of Genetics and Cell Biology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy,

³Dept of Obstetrics and Gynecology, San Raffaele Hospital, Milan, Italy

Introduction: This study aims to quantify total and fetal cell-free DNA (cfDNA) in maternal plasma at different gestational ages and to assess whether this could represent a reliable predictive marker of preeclampsia (PE) before clinical onset.

Methods: We performed a qPCR assay to compare the cfDNA concentration of hypermethylated and unmethylated RASSF1A promoter gene sequences in maternal plasma among 3 groups of pregnant women. These included 17 women with overt PE, 33 women at risk for the disease subsequently differentiated into 9 who developed PE and 24 who did not, and 73 controls. All women at risk were consecutively sampled throughout the whole gestation.

Results: Both total and fetal cfDNA had a good diagnostic performance in distinguishing patients with overt PE from healthy controls. When comparing women at risk who developed PE to women at risk who did not, the predictive capability was satisfactory at a gestational age ranging from 17 to 30 weeks. This allowed establishing within this time interval a cut-off value of 735 GE/ml for total cfDNA (87.5% sensitivity and 70.0% specificity), and a cut-off value of 7.49 GE/ml for fetal cfDNA (100% sensitivity and 50% specificity). cfDNA levels turned positive several weeks before the onset of the disease: from 2 to 18 weeks for total cfDNA and from 8 to 17 weeks for fetal cfDNA.

Discussion: The simultaneous use of total and fetal cfDNA would allow an accurate monitoring and prevention of PE development thus suggesting that RASSF1A could represent a potential biomarker of PE.

P020

PROTEIN SIGNATURE OF HUMAN AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELLS (HA-MSCS) ISOLATED FROM OBESE WOMEN

V. Capobianco¹, M. Caterino¹, L. Iaffaldano¹, C. Nardelli³, A. Sirico⁴, L. Pastore³, L. Del Vecchio³, P. Martinelli⁴, L. Sacchetti¹, P. Pucci¹

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate S.C.a R.L., Napoli

²Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

³CEINGE-Biotecnologie Avanzate S.C.a R.L., Napoli - Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

⁴Dip. di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Napoli

Background: Maternal obesity and nutrient excess in utero increase the risk of newborns to develop metabolic diseases in adult life. In mammals, the placenta is the main interface between foetus and mother. It regulates intrauterine development, modulates adaptive responses to suboptimal in utero conditions and is also an important source of human amniotic mesenchymal stem cells (hA-MSCs). Consequently, placental alterations could modify the intrauterine environment and affect foetal growth. We and others previously found epigenetic and proteomic alterations in placenta during obesity (Nardelli C et al. Int J Obes 2014, Oliva K et al. J Mol Endocrinol 2012). Here we investigated the protein profile in hA-MSCs isolated from obese and control women to evaluate differential expression patterns associated with the obese phenotype. **Methods:** hA-MSCs from 16 obese and 7 control women with pre-pregnancy BMI (mean/SEM) 40.3/1.8 and 22.4/1.0 kg/m², respectively, were isolated from amnion at delivery. Cells were phenotyped by flow cytometry to verify their mesenchymal origin and studied for protein profile by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis followed by mass spectrometry. Differently expressed proteins were organized in biological pathways by bioinformatics (Kegg database). **Results:** Eighty-one differently expressed proteins were identified, 63% was increased and 37% decreased in obese vs control hA-MSCs. Most proteins clustered into the following cellular functions: Processing in endoplasmic reticulum (HSP90B1, HSPA5, RBP1, SEC23A, PDIA4, HSPH1, HSPA8 and VCP); Focal adhesion (FLNA, FLNB, ACTG1, ACTN1 and PP1R12A); Metabolic pathways (ALDOC, ACLY, ALDH7A1, HK1, DLST, PKM, ENO1, PGD, PFKP and MTAP); Regulation of actin cytoskeleton (MYH9, ACTG1, PP1R12A and ACTN1); RNA degradation (ENO1, HSPD1 and HSPA9).

Conclusions: Our data show that several protein alterations characterize hA-MSCs during obesity. This obesity-associated proteome is predicted to significantly affect cellular metabolism and the structural integrity of these hA-MSCs. A more detailed study of this proteome will reveal its contribution to the newborn risk for obesity or for obesity-associated diseases.

This work has been supported by POR CAMPANIA FSE 2007-2013, Project DIAINTECH Italy.

P021

GENDER INFLUENCE ON MIRNA PROFILES OBSERVED IN VISCERAL ADIPOSE TISSUE IN OBESITY

V. Capobianco¹, C. Nardelli², L. Iaffaldano¹, A. Tafuto¹, V. Pilone³, P. Forestieri⁴, L. Sacchetti¹

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate S.C.a R.L., Napoli

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate S.C.a R.L., Napoli - Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli

³Dip. di Medicina e Chirurgia, Università di Salerno, Salerno

⁴Dip. di Medicina Clinica e Chirurgia, Università di Napoli Federico II, Napoli

Background: Visceral obesity is a major risk factor for obesity-related disorders. In recent years, it was suggested that the expression of visceral adipose tissue (VAT) genes could depend also on an miRNA-based mechanism. Obesity is more frequent in women than in men. We previously associated VAT miRNA/protein target pairs to the obese female phenotype (Capobianco V et al. J. Proteome Res. 2012). In the present study we measured miRNA expression in VAT from obese and non-obese males to determine if a gender-associated miRNA profile is present in obesity.

Methods: VAT biopsies were collected from obese (n=10, BMI [mean±SEM] 44±0.89 kg/m²) and non-obese males (n=8, BMI=25.4±1.06 kg/m²) during surgery (bariatric surgery and cholecystectomy, respectively). The VAT expression of 365 miRNAs was investigated with the TaqMan Array Human MicroRNA Panel v1.0. Target genes of miRNAs were predicted by TargetScan. Lastly, the Kegg database was used to identify miRNA-regulated biological pathways.

Results: We found that 223/365 (61.1%) miRNAs were expressed in VAT from obese and non-obese males, 45/365 (12.3%) were not expressed, and 97/365 (26.6%) were expressed only in obese males (i.e., "obesity-specific miRNAs"). Furthermore, only 5/97 miRNAs were expressed in at least 6/10 obese males, namely, miR-122a, -409-5p, -520d, -202 and -219. Notably, obese-specific miRNAs were more numerous in obese females (16/72, 22%) than in obese males (5/97, 5.1%), and three occurred in both sexes (miR-122a, -202, -409-5p). These gender-independent miRNAs were predicted to significantly (P<0.001) regulate the following pathways: MAPK signaling, adipocytokines, regulation of actin-cytoskeleton, cytokine-cytokine receptor interaction, and Jak-STAT and PPAR signaling.

Conclusions: miRNAs are involved in the deregulation of VAT gene expression in both sexes, and miRNAs found in both sexes are predicted to regulate pathways previously associated with obesity. The effect exerted by this epigenetic mechanism differs between the sexes and could contribute to the higher prevalence of obesity in females than in males.

This work has been supported by POR CAMPANIA FSE 2007-2013, Project DIAINTECH Italy.

P022

VALUTAZIONE DELLO STATO MUTAZIONALE DEL GENE EGFR NEL CARCINOMA POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC) CON METODO RT-PCR

C. Siracusa¹, S. Signorini¹, S. Besana¹, P. Brambilla²

¹S.C. Analisi Chimico Cliniche Desio/Carate/Giussano - AO di Desio e Vimercate

²Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano - Bicocca, Monza (MB)

Introduzione: NSCLC rappresentano circa l'80% di tutti i tumori del polmone, caratterizzati dall'attivazione funzionale dei fattori di crescita e dei recettori cellulari della famiglia degli Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). L'attività tirosinchinasica dell'EGFR sfugge ai normali controlli e genera una cascata di trasduzione del segnale intracellulare che porta alla proliferazione incontrollata delle cellule, blocco dell'apoptosi, invasione, metastatizzazione e neoangiogenesi.

Nella pratica clinica sono impiegati inibitori del dominio tirosinchinasico dell'EGFR (EGFR-TKIs: Erlotinib e Gefitinib) ed esiste una relazione tra la presenza di mutazioni attivanti o inibenti (esoni 18, 19, 20 e 21) nel dominio tirosinchinasico dell'EGFR e una risposta clinica agli EGFR-TKIs [1].

Scopo: Valutazione dello stato mutazionale del gene EGFR tramite metodica RT-PCR (Cobas Z480, Roche) e confronto con il metodo in uso (Sequenziamento Sanger). Materiali e metodi: La metodica RT-PCR (Cobas Z480, Roche) è in grado di rilevare le mutazioni negli esoni 18, 19, 20 e 21 del gene EGFR, con un livello di mutazione minimo del 5%, partendo da un volume iniziale standard di 50 ng per pozzetto di reazione. L'analisi avviene esclusivamente nelle regioni target del gene EGFR.

30 campioni consecutivi, sono stati analizzati mediante RT-PCR (Cobas Z480) e sequenziamento diretto per gli esoni 18, 19, 20 e 21.

Risultati e conclusioni: I risultati ottenuti concordano per tutti e 4 gli esoni, ad eccezione di un campione Wild-Type per l'esone 19 mediante sequenziamento ed invece positivo per delezione in RT-PCR, probabilmente per la maggior sensibilità di quest'ultimo metodo.

La metodica RT-PCR (Cobas Z480, Roche) presenta i seguenti vantaggi: (a) maggior sensibilità rispetto al sequenziamento; (b) ampliamento del pannello mutazionale con disponibilità dei risultati per i 4 esoni in una sola seduta analitica; (c) riduzione dei tempi di analisi (90 minuti rispetto a più giorni necessari per amplificazioni e sequenze); (d) riduzione dei tempi di refertazione. Questo si traduce in una migliore e più tempestiva assistenza al paziente con una terapia mirata e accurata.

1. AIOM - Linee Guida Neoplasia del Polmone, Ed 2013.

P023

MICRO-RNAs AND THEIR ROLES IN CENTENARIANS

F. Balzano¹, M. Deiana², A. Mannu¹, B. Porcu¹, S. Pasella¹, C. Carru¹, L. Deiana¹

¹Dip. Scienze Biomediche, Università, Sassari

²Ass. "Isola dei centenari", Sassari

Introduction: Micro-RNAs (miRNAs) represent a family of small non-coding ribonucleic acids that post-transcriptionally inhibits the expression of their target messenger RNAs (mRNAs), thereby acting as general gene repressors (1). In this study we examined the expression of eight microRNAs (miR-125b, miR-425, miR-200b, miR-200c, mir-579, mir-212, mir-126 and mir-21) in plasma taken from ten healthy controls human with an average age of 40 years and we have made a comparison with the expression of microRNA taken from 14 centenarians. All samples were recruited from the biobank longevity AKeA Project (Sardegna). The altered expression of these miRNAs in cancer and inflammatory diseases is found in several studies. We are interested in studying the involvement of miRNAs in longevity. Human aging is an extremely complex process, there is every reason to believe that miRNAs play a role in modulating the duration and the aging process.

Materials and methods: Using a Life Technologies' protocol to isolate and quantify plasma miRNAs from EDTA treated blood, we have analyzed eight miRNAs extracted from seven human healthy controls. Total RNA containing small RNA was isolated from plasma using Trizol LS reagent (Life Technologies) combined to mirVana miRNA column. Taqman MicroRNA Assays were used to analyze expression profiling of the plasma miRNAs of interest. All reagents, primers and probes were obtained from Life Technologies Italy. miRNA expression levels were quantified using the IQ5 BIORAD. Real-time PCR was done in triplicate. The relative expression of the mature miRNAs was analyzed using the software REST. The non parametric bootstrapping test was used to evaluate expression differences of miRNAs between cases and controls.

Results: Recent studies are linking altered miRNA function to a range of age-related diseases and processes of aging. In this study we show that mir-125b and mir-126 increased in centenarians than in controls. Others miRNA analyzed show no significant differences between cases and controls. Identification of miRNAs that modulate aging will provide important mechanistic insights into the molecular basis of aging.

1. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. Cell 2004;116:281-97.

- Funded by L.R. 7/2007.

P024

CHANGES IN PLASMA CYTOKINE PROFILES WITH AGING IN HEALTHY SUBJECTS

S. Pasella¹, S. Pinna¹, A. Baralla¹, M. Deiana², A. Mannu¹, M.S. Marras¹, F. Balzano¹, A. Zinellu¹, C. Carru¹, L. Deiana¹

¹ Department of Biomedical Sciences, Sassari University

² Association "Isola dei Centenari", Sassari

Introduction: Aging is associated with a functional decline of the body, characterized by a deregulation of the immune system and the production of proinflammatory cytokines both conditions often associated with several human diseases. Although it was previously demonstrated that plasma cytokines levels vary with aging there are few and conflicting studies regarding the healthy aging (1). Also, few data are available on the cytokine profiles of a very elderly population and most of studies have focused on a limited set of cytokines.

Aim: The aim of this study was to evaluate the changes in plasma concentrations of 35 cytokines in healthy males and females aged from 20 to 106 years.

Methods: The study sample consisted of 140 healthy subjects, grouped by age and sex (male/female: 1:1) as follows: young, <60 years, n=43; elderly, ≥60 anni, n=44; centenarians ≥100anni, n=53. The quantitative analysis of the cytokines was performed using magnetic beads-based sandwich immunoassays with Bio-Plex MAGPIX multiplex reader instrument (Biorad).

Results and Discussion: Plasma levels of some proinflammatory cytokines (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1b and soluble CD40 ligand), the growth factor IL-7 and the granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) were significantly higher in elderly subjects; the opposite trend was observed for the proinflammatory cytokines IL-17 and IL-33 released by T-helper 17 cells. The plasma cytokine profile of the elderly subjects is similar to that of centenarians except for IP-10, whose plasma levels show a very strong correlation with age ($\rho=0,7$, p-value <0,0001). Also were observed significant differences in plasma cytokines levels between males and females in young (IL-1b, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1a, PDGF-bb, IL-25, IL-31) and in elderly (MIP-1b and IL-33); in contrast males and females centenarians have similar plasma cytokines concentrations.

Conclusions: Further studies are needed to better understand the changes in plasma cytokine levels with age and their potential use as predictive markers or therapeutic in age-related diseases.

1. Kim HO, Kim HS, Youn JC, et al. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. J Transl Med 2011;9:113.

Funded by L.R. 7/2007

P025

USE OF GAS CHROMATOGRAPHY ORAL CHROMA™ IN THE ASSESSMENT OF VOLATILE SULFUR COMPOUNDS FOR BREATH'S ANALYSIS IN ORAL AND GASTRIC AFFECTIONS

F. Coghe¹, M.P. Contu³, P. Ferraguti¹, N. Arena⁴, G. Bogio⁴, R. Faa¹, M. Pautasso¹, G. Serrelli⁴, B. De Magistris⁴, A. Piras⁴, V. Piras³, G. Orrù³

¹Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, AOU di Cagliari

²Laboratorio SPOKE Sequenziamento, AOU di Cagliari

³Oral Biotechnology Laboratory, Università di Cagliari

⁴Università di Cagliari

Introduction: Breathomics (Breath-based metabolomics) is a new biotechnology approach that allow us to diagnose some human diseases by the oral breath analysis. The method is based on the identification and quantification of volatile organic compound (VOC) in breath, by a new portable gas chromatography's tools such as Oral Chroma®. This instrument is able to detect and quantify three different volatile sulfur compounds, VSC (H₂S, CH₃S, (CH₃)₂S) in 5 ml of oral breath, in fast time and with good analytical accuracy. In addition, different authors recently have been described as a comparative analysis of VSC could be useful in the diagnosis of different oral or systemic diseases such as: (i) oral tongue halitosis or/and gastric affection such as *Helicobacter pylori* infection.

Methods: In the present study we have investigated the role of VSC profile in a court of 50 patients that reported oral halitosis and 30 subjects without any breath problem, aged from 10 to 60, recruited from the Department of Dental Disease Prevention (University of Cagliari).

For each patient, three different molecular analysis have been done: (i) Breath VSC analysis (ii) Detection of halitogen bacteria on tongue swab by real time PCR, (iii) a breath test, Helico Kit® that conformed the presence of *H. pylori* on the stomach.

Results. The results showed that a positive correlation was observed for H₂S amount and the presence in tongue biofilm specimen of halitogen bacteria DNA (p <0.01), of positive samples most representative bacteria identified were: *Tannerella forsythia* (70%) and *Prevotella intermedia* (5%) The presence of (CH₃)₂S was positively associated with chronic gastric affections and 31% of these subjects resulted positive for breath test HelicoKit®.

Conclusion: A high number of Sardinian patients was found positive for VSCs in the oral breath, (just 35 positive periodontal cases out of 50). H₂S was the most representative (62 % of the VSC positive specimens) indicating a clinic oral Halitosis. Our experience suggests that this approach is suitable for a rapid laboratory diagnosis for oral (tongue) halitosis or for detect gastric infection due at *H. pylori*.

Dadamio J, Laleman I, De Geest S, et al. Usefulness of a new malodour-compound detection portable device in oral malodour diagnosis. *J Breath Res* 2013;7:046005.

P026

DESIGNING OF A RT REAL TIME PCR ASSAY BASED ON NS1 GENE FOR RAPID DETECTION OF USUTU VIRUS (USUV).

F. Coghe¹, G. Serafi², A. Scano², P. Ferraguti¹, M. Pautasso¹, R. Cappai¹, F. Puggioni¹, A. Gigante¹, G. Serrelli³, L. Allena³, P. D'Andrea³, S. Fais², D. Pirroni¹, G. Senis², G. Orrù²

¹Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, AOU di Cagliari

²Laboratorio SPOKE Sequenziamento, AOU di Cagliari

³Università di Cagliari

Introduction: Usutu virus belongs to the Japanese encephalitis virus group (the isolates exhibited 97% identity) within the family Flaviviridae closely related to West Nile virus (WNV). Both share in nature an enzootic infectious cycle between avian hosts and mosquito vectors (i.e. *Culex* spp.). The distribution areal is expanding in several European countries, including Italy; the simultaneous spatial and temporal co-circulation of new flaviviruses require a new approaches in the laboratory diagnosis for Flaviviridae infection in humans. Methods: Primers for real time PCR were designed using 14 NS1 sequences extracted from the NCBI database GenBank of USUV complete genome, from KF573410 to EF206350 accession numbers. Possible oligonucleotide dimer formation, self-complementarity and the annealing temperatures of the real time PCR were calculated using the Oligo program vers. 6 (MedProbe, Oslo, Norway). The real time PCR primers amplified a region of NS1 gene, coding for a inhibitor of signal transduction for host innate immunity. The theoretic melting temperatures of the different PCR amplicons (T_m) were calculated using module 1 of the DNA hybridization prediction algorithm program "HYTHER" with the following sets of parameters: (i) monovalent cation concentration at 0.05 mol/L, (ii) Mg²⁺ at 0.004 mol/L, (iii) a concentration of PCR products (Top/Bottom strands) at 10⁻⁷ mol/L and (iv) hybridisation temperature at 50 °C.

Results: In silico results, by using of a cDNA fragment corresponding to PCR amplicon, have demonstrated that procedure is suitable for a direct laboratory diagnosis for (USUV).

Conclusion: (USUV) is a mosquito-borne flavivirus that emerged few years ago in Europe in wild birds and in humans. A based surveillance for this virus by a direct diagnosis in clinically symptomatic humans and in vectors could be important in Italy for public health for the reason that it provides data about USUV activity and distribution. Further studies will be conducted to estimate "in field" the sensitivity and the specificity of the method.

Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, et al. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill* 2011;16(31).

P027

**TUSCANY MENINGOCOCCAL OUTBREAK:
SHARING OF DIAGNOSTIC PROTOCOL OF
BACTERIAL MENINGITIS. THE POWER OF REAL-
TIME PCR: CSF VS BLOOD**

L. Bianchi, S. Donati, Z. Napoli, M. Niccolai, R. Lari

U.O laboratorio Analisi, ASL 3 Pistoia

Background and aims: Meningococcal meningitis, for its rapid aggravation of patient condition, should be detected as fast as possible. Tuscany Region, after the recent group C meningococcal outbreak (16 cases with a mortality rate of 25%) has recommended the inclusion of the RealTime (RT)-PCR method in the diagnostic protocol. Aim of this study was:1) to confirm RT-PCR like the most sensitive method to detect bacterial meningitis;2) to underline the importance of rapid molecular test (FilmArray technology, FAT) validated at least on cerebrospinal fluid (CSF) to overcome low sensitivity and postanalytical standardization of Gram staining (GS); 3) to remark the importance of sending to the laboratory a blood sample (BS) to improve the diagnosis and patient outcome.

Methods: Clinical records: 42 patients with bacterial meningitis (analyzed matrices: CSF and BS) and 20 patients with severe sepsis (analyzed matrices: BS). Diagnosis was performed with RT-PCR (EuSepScreen adulti/lattanti, Eurospital and LiverRiver, DID) and all samples were retested with FAT (Blood Culture Identification Panel, Biomérieux). Bacterial strains with known concentration (ATCC and NCTC) were used to quantify bacterial load.

Results: GS detected 42.8% of positive cases (18/42). 65% of RT-PCR positive samples, with Cycle threshold (Ct) <29, were confirmed with FAT. Aetiological agent was detected in BS in 68% of cases (41% confirmed with FAT). Bacterial load discrepancy detected between CSF and BS was 10^2 - 10^3 Colony Forming Unit (CFU)/ml. 3/11 cases of pneumococcal meningitis died and their CSF bacterial load was $>10^7$ CFU/ml (Ct <15). 20 patients with severe sepsis had a BS bacterial load of 10^3 - 10^5 CFU/ml ($26 < CT < 32$).

Conclusions: 1) FAT is sensitive, rapid, easy to use and adequate to replace GS as emergency test; 2) RT-PCR is the most sensitive method to detect bacterial meningitis and it is the most effective for patient follow-up; 3) in sepsis and meningitis cases RT-PCR performed on BS can quickly detect responsible pathogens and improve patient outcome.

Bianchi L, Napoli Z, Donati S, et al. Emergency management in bacterial meningitis and sepsis: application of Real Time PCR and FilmArray Technology performed directly on cerebrospinal fluid and blood samples. *Microbiologia Medica* 2015, in editing.

P028

**USEFULNESS OF MICROARRAY-BASED ASSAY
FOR THE IDENTIFICATION OF BACTERIA AND
RESISTANCE MARKER ISOLATED IN BLOOD
CULTURES**

F. Coghe¹, P. Ferraguti¹, G. Orrù², M.P. Contu³, G. Serafi³, A. Scano², R. Faa¹, G. Serrelli⁴, R. Cappai¹, G. Denotti³, M. Pautasso¹, V. Fanos⁵

¹Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, AOU di Cagliari

²Laboratorio SPOKE Sequenziamento, AOU di Cagliari

³Oral Biotechnology Laboratory, Università di Cagliari

⁴Università di Cagliari

⁵Istituto di Patologia e Terapia Intensiva Neonatale, Università di Cagliari

Introduction: The rapid identification of the bacteria in blood samples is crucial for the patient management and for a good performance in antimicrobial therapy. Here we report the evaluation of a new DNA microarray procedure for the identification of pathogens causing bloodstream infections, it based on automated platform with multiplex capabilities that rapidly and accurately detect infectious pathogens and drug resistance markers without relying on time-consuming culture methods. This system is very fast to produce bacterial identification and drug susceptibility pathogen profile, in fact it provide results in 3 hours on 2-3 days in conventional microbiological approach.

Methods: We evaluate the microarray-based Verigene® Blood Culture assays for the identification of genus or species targets and genetic resistance determinants in positive blood culture broths. For each test we used Verigene® platform (V processor) that provided at: (i) DNA extraction of 350 ul of blood broth sample, (ii) library of specific ribosomal gene fragments, (iii) Successfully the dry substrate was read by microarray base method. We analyzed a total of 197 blood specimens, recruited of Institute of Puericulture and Neonatal Section, University of Cagliari. 112 (56%) were sampled from puericulture session, 2 (1%) of neonatal and 64 (32%) from intensive care unit session.

Results: A total of 19 samples (9,6%) resulted positive with Verigene® System and with traditional cultural method, 7 were identified from puericulture samples. Among the these positive blood culture samples, 5 (72%) Gram-negative and 2 (28%) Gram-positive bacteria were detected, *S. agalataiae*, *S. epidermidis* met-R, *P.aeruginosa* *K. oxytoca* and *K. pneumonia*, were the species identified. In addition 12 samples from intensive care unit, on 64 analyzed (19%), resulted positive The most commonly identified bacteria were *S. marcescens*, *S. haemolyticus* met-R and *E coli* (16%).

Conclusion: Overall, this molecular procedure no shown conflicting in comparison with the traditional methods, and microarray based method could be suitable for laboratory diagnosis in sepsis.

Raich T, Powell S. Identification of bacterial and fungal pathogens from positive bloodculture bottles: a microarray-based approach. *Methods Mol Biol* 2015;1237:73-90.

P029

ANALISI MOLECOLARE NELLE INFEZIONI FUNGINE OCULARI

S. Egiziano¹, A. Ramuscello¹, C. Salbe¹, F. Birattari², A. Franch², I. Vallini³, M. Favarato¹

¹AULSS 12 Veneziana, Dipartimento di Patologia Clinica, UOS Diagnostica Molecolare

²AULSS12 Veneziana, UOC Oculistica, Centro Cornea e Superficie Oculare

³Bird S.r.l.

Le infezioni fungine della cornea rappresentano un'importante gruppo di infezioni oculari con sintomi generalmente poco specifici e simili alla maggioranza delle cheratiti batteriche. Tali infezioni necessitano di una diagnosi rapida per aumentare le possibilità di una completa remissione. Per tali esigenze cliniche è stata avviata la messa a punto tecnica e la validazione clinica di un metodo analitico basato sulla tecnologia di PCR Real-Time che permette di ricercare contemporaneamente sequenze genomiche specifiche di *Aspergillo* spp, *Candida* spp e *Fusarium* spp su campioni oculari, in tempi estremamente rapidi e con elevata specificità, sensibilità e riproducibilità. Sono stati analizzati 20 campioni oculari (17 scraping corneali, un tampone del canale lacrimale, un lavaggio della camera anteriore ed un secreto oculare), prelevati da pazienti con sospetta infezione corneale da funghi. Il DNA è stato estratto mediante utilizzo del kit commerciale QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) e gli acidi nucleidi sono stati sottoposti ad amplificazione multiplex gene-specifica con PCR Real-Time (Bird S.r.l.) su strumentazione RotorGene Q (Qiagen), per l'identificazione simultanea di sequenze specifiche del genoma dei 3 target, situate all'interno di regioni genomiche altamente conservate e che codificano per diversi frammenti di rRNA: ITS2 (*Aspergillo* spp e *Fusarium* spp) e 18S (*Candida* spp) [1]. Dei 20 pazienti analizzati, 9 sono risultati positivi alla ricerca di DNA fungino (45,0%): 6 campioni per *Fusarium* spp, 2 per *Candida* spp, ed uno per *Aspergillo* spp. I restanti pazienti, negativi all'indagine molecolare, sono risultati affetti da infezioni oculari causate da altri patogeni. La sensibilità del test è stata valutata analizzando diluizioni seriali ottenute da colture fungine per ciascuno dei target ricercati e la specificità è stata ulteriormente confermata escludendo la presenza di cross-reattività con il genoma di altri patogeni. Sono stati inoltre definiti il limite del bianco ed il cut-off clinico della metodologia sperimentata. L'impiego della tecnologia molecolare in questo ambito consente di ottenere risultati in tempi molto rapidi, permettendo al clinico tempestive manovre decisionali sull'approccio terapeutico.

1. Embong Z, et al. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmol* 2008;8:7.

P030

INDAGINI MOLECOLARI NELLE INTERSTIZIOPATIE POLMONARI

S. Egiziano, A. Ramuscello, I. Masetti, C. Salbe, M. Favarato

AULSS 12 Veneziana, Dipartimento di Patologia Clinica, UOS Diagnostica Molecolare

Le interstiziopatie polmonari (o pneumopatie infiltrative diffuse) sono un gruppo numeroso di malattie dovute a lesioni (infiammazione e/o fibrosi) del tessuto di rivestimento degli alveoli polmonari che nel loro insieme rappresentano la causa più frequente di malattie polmonari croniche non ostruttive. Tra le cause di interstiziopatie polmonari vi sono le polmoniti virali sostenute da virus erpetici, nelle loro forme acute, sub-acute e croniche [1]. Lo scopo di questo studio è la validazione di un metodo analitico semi-quantitativo basato sulla tecnologia di PCR Real-Time per la ricerca di sequenze genomiche specifiche per Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV), Herpes Simplex Virus 1 (HSV1), Herpes Simplex Virus 2 (HSV2) e Varicella Zoster Virus (VZV) in campioni di broncolavaggio alveolare (BAL) e broncoaspirato. Sono stati analizzati 18 campioni provenienti da pazienti con interstiziopatia polmonare di sospetta origine virale, dei quali 12 BAL e 6 broncoaspirati. Il DNA virale è stato estratto con tre differenti metodi estrattivi: una metodica manuale mediante utilizzo del kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) e due metodiche automatizzate su strumentazione NucliSENS® EasyMAG® (Biomerieux) ed ELITe Galaxy (ELITechGroup). Successivamente gli acidi nucleici sono stati sottoposti ad amplificazione gene-specifica con PCR Real-Time (Real-Time Alert Q-PCR, ELITechGroup) su strumentazione 7300 Real-Time PCR System e 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems). Dei 18 campioni analizzati, 15 sono risultati positivi per la ricerca di DNA virale (83,3%), in particolare: 9 per CMV-DNA, 11 per EBV-DNA, 9 per HSV1-DNA ed uno per VZV-DNA. In 11 pazienti era presente una coinfezione sostenuta da due o più patogeni. I risultati ottenuti mediante i tre diversi metodi estrattivi utilizzati concordavano per tutti i campioni analizzati. L'impiego della tecnologia molecolare consente di ottenere risultati in tempi estremamente rapidi, con elevata specificità e sensibilità. Risulta inoltre essere un indispensabile approccio diagnostico per tutti quei pazienti immunocompromessi che, risultando negativi alla ricerca anticorpale sierologica, sfuggirebbero ad una rapida diagnosi e pertanto a tempestive manovre terapeutiche.

1. Wallis A, Spinks K. The diagnosis and management of interstitial lung diseases. *BMJ* 2015;350:h2072.

P031

EVALUATION OF THREE DIFFERENT METHODS PERFORMANCE FOR QUANTIFICATION OF BRCA1/2 LIBRARIES USED FOR NEXT-GENERATION SEQUENCING

G. Canu, M. De Bonis, C. Santonocito, P. Concolino, A. Minucci, E. Capoluongo

Laboratory of Clinical Molecular and Personalized Diagnostics, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Rome, Italy

Background: A common step of the next-generation sequencing (NGS) technologies is the loading a precise number of DNA library molecules to optimize the data yield. The incorrect library quantitation therefore results in compromised data yields or completely failed sequencing runs. In order to optimize this crucial step, we evaluated three different methods for library quantitation.

METHODS. We compared concentrations obtained on 100 DNA samples, processed for preparation of BRCA1/2 libraries. We used three methods: 1) QuantiT™ PicoGreen® dsDNA Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), the reference method, 2) UV absorbance on NanoPhotometer™ (Implen, München Germany) and 3) Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Grand Island, NY). The quality of the DNA libraries was previously evaluated by fragment analysis on ABIPrism 3130 instrument. Regression analysis and Bland-Altman plots were used for comparison between assays and the statistical analysis was performed by MedCalc software.

Results: Statistical analysis showed a good correlation between PicoGreen® and Qubit® methods (correlation coefficient (R^2): 0.82, $p < 0.0001$, CI at 95% from 0.86 to 0.94, mean difference: 3.2 ± 9.1), and an acceptable correlation between PicoGreen® and UV absorbance (R^2 : 0.75, $p < 0.0001$, CI at 95% from 0.8 to 0.91, mean difference: -0.6 ± 10.6). Contrastingly, for samples with concentrations < 60 ng/ μ l, R^2 resulted 0.76 between PicoGreen® and Qubit® ($p < 0.0001$, CI at 95% from 0.81 to 0.92) while R^2 was 0.6 between Qubit® and UV absorbance ($p < 0.0001$, CI at 95% from 0.67 to 0.85). Mean differences were 2.6 ± 6.4 and -2.6 ± 8.3 , respectively. For samples with concentrations > 60 ng/ μ l, R^2 was 0.48 between PicoGreen® and Qubit® ($p = 0.0013$, CI at 95% from 0.34 to 0.88), while R^2 was 0.55 between PicoGreen® and UV absorbance ($p = 0.0004$, CI at 95% from 0.42 to 0.9) and mean differences were 5 ± 16.4 and 7.6 ± 4.9 , respectively.

Conclusions: Our data suggest that, compared to PicoGreen®, UV absorbance and Qubit® assays allow an acceptable evaluation of library DNA amounts, above all for concentrations < 60 ng/ μ l. On the contrary, for those > 60 ng/ μ l, Qubit® and UV absorbance methods tend to underestimate library amounts. We can conclude that PicoGreen® remains the main reference method for the accurate quantitation of DNA libraries.

P032

CELL-FREE DNA EXERCISE-INDUCED RELEASE AND DNA PROFILING IN YOUNG NATIONAL SOCCER TEAM

G. Canu, M.C. Mele, M. De Bonis, C. Zuppi, C. Carrozza, E. Capoluongo

Department of Diagnostic and Laboratory Medicine, CriBeNS: Centro di Ricerca in Biochimica e Nutrizione dello Sport, Catholic University, "A. Gemelli" Hospital, Rome, Italy

Background: Increased plasma concentrations of cell-free DNA (cfDNA) are considered a hallmark of various clinical conditions. Intense physical exercise has also been shown to increase cfDNA concentrations. Athletic performance is dependent on complex phenotype considered a multi-factorial polygenic trait. Muscle energy production, tissue oxygenation, vitamins metabolism, bone mineral density are genetically determined, playing an essential role in determining athletic performance. Knowledge of the biochemical and genetic status of factors influencing athlete capabilities, could allow the elaboration of individualized training programs and nutritional planning, to achieve optimal performance. We investigated the cfDNA concentrations pre and post exercise in a young soccer team, compared to biochemical assays. To provide a wide scenario about their athletic performance, we genotyped the athletes about some genes involved in endurance/sprint performance.

Methods: 20 players of the under 18 Lega Pro National Soccer Team were studied during training. Genomic DNA and serum samples were obtained to perform genetic and biochemical tests. CfDNA concentration in plasma was obtained to evaluate the trend of release. Biochemical tests were performed by enzymatic reaction and CLIA methods.

Results: Athletes showed cfDNA concentration increase after first training T_1 that decreased but not returned baseline after the second training and recovery T_2 . They showed increased also CK and LDH levels at T_1 that returned baseline at T_2 . They had low levels of 25-OHD and folate measured only pre-exercise. They preserved the cortisol rhythm during exercise. DNA profiling was not associated with positive risk of bone fractures. They showed prevalence of sprint capacity.

Conclusion: This is a first study in which studied the trend of cfDNA release during exercise and DNA profiling in a young soccer team to improve personalized training and nutritional programs. The athletes not showed overtraining on basis of biochemical parameters but their low levels of vitamins suggest the need of nutritional improvement. Unfortunately, the phenomenon of cfDNA release still remains unknown. Probably, in this team, the high cfDNA level at T_2 , higher in defenders group, maybe could be due to clearance reduced because of the training during several days until the final race.

P033

NRXN1 DELETION IN TWO PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER

C. Munno¹, F. Verdesca¹, A. Vitale², B. Lombardo¹, L. Pastore¹

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Dip. di Scienze Motorie e del Benessere, Università degli Studi di Napoli "Parthenope", Napoli

Background: The neurexins (NRXN) are a group of three highly polymorphic cell surface receptors that influence synaptic activity and contribute to intellectual disability and psychiatric disorders. Neurexine1 (NRXN1) binds to neuroligin (NLGN) to form a calcium-dependent neurexin/neuroligin complex in the synapses of the central nervous system. This complex is crucial for an efficient neurotransmission and is involved in the formation of synaptic contacts. There is evidence that CNVs involving NRXN1 are associated with cognitive ability, language development disorders, autism and several psychiatric disorders, in particular, schizophrenia (Viñas-Jornet M, et al. Mol Genet Genomic Med 2014;2:512-21).

Methods: A high resolution array comparative genomic hybridization (a-CGH) 4x180K (Agilent Technologies) was performed on two unrelated patients with autism spectrum disorder, in order to identify potential mutations and characterize the clinical phenotype at molecular level. The a-CGH used contains 170,334 60-mer oligonucleotide probes that cover the whole genome with an average spatial resolution of 13 Kbp. DNA digestion, labeling and hybridization were performed according to the manufacturer's protocols.

Results: Using a-CGH analysis, we identified in the first patient a heterozygous deletion in 2p16.3 region of ~73 Kbp and, in the second patient, a heterozygous deletion in 2p16.3 region of ~174 Kbp. Both deletions involved NRXN1 and were further confirmed by quantitative real time PCR.

Conclusions: We analyzed by a-CGH two unrelated patients with autism spectrum disorder and identified a deletion in the NRXN1 gene as potential causative mutation. With the clinical implementation of genomic microarrays and the access to next generation exome sequencing, will be identified and better characterized rearrangements as a cause of neurological disorders in patients presenting for genetic services. This information will be important for medical management and therapy with more accurate and specific genetic counseling for affected individuals and at risk family members.

P034

CTNNA3 DELETION IN FIVE PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER

F. Verdesca¹, C. Munno¹, A. Vitale², B. Lombardo¹, L. Pastore¹

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Dip. di Scienze Motorie e del Benessere, Università degli Studi di Napoli "Parthenope", Napoli

Background: Catenin (Cadherin-Associated Protein), Alpha 3 (CTNNA3) is a member of the α -catenin family expressed primarily in the heart and testis but at lower levels in the brain and has a crucial role in cell adhesion, one of the major pathways implicated in autism spectrum disorder (ASD). CTNNA3 has been implicated as a possible autism candidate gene. Previous studies reported common single nucleotide polymorphism (SNP) association and the occurrence of rare CNVs intersecting CTNNA3 in ASD cases (O'Roak BJ, et al. Nature 2012;485:246–50). The CTNNA3 gene, that span 1.8 Mbp, is located in 10q21.3 region and contains 18 exons.

Methods: Detection of copy number variations was performed by array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) experiments by using 4x180K Agilent Technologies platform in five unrelated patients with autism spectrum disorder. All of these patients exhibited dysmorphic facial features, developmental delay, learning disability and mental retardation. The a-CGH used contains 170,334 60-mer oligonucleotide probes that cover the whole genome with an average spatial resolution of 13 Kbp. DNA digestion, labeling and hybridization were performed according to the manufacturer's protocols.

Results and Conclusions: By using a-CGH analysis, we have identified five heterozygous deletions in 10q21.3 region ranging from 47 Kbp to 178 Kbp in five unrelated patients affected by autism spectrum disorder. All deletions encompassed CTNNA3. The experimental validation of CTNNA3 deletions was carried out by quantitative real time PCR. The alterations observed are of particular interest as CTNNA3 is a very promising candidate gene for ASD based on its biological function: in fact, like other α -catenins, CTNNA3 participates in the canonical Wnt signalling pathway which plays an important role in brain development and synaptic function.

P035

IMPAIRED HOMEOSTASIS OF PLASMA STEROLS IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS: PRELIMINARY DATA OBTAINED BY GAS CHROMATOGRAPHY (GC-FID AND GC-MS)C. Sica¹, M. Gelzo², A. Elce³, F. Papagni¹, A. Dello Russo¹, G. Castaldo⁴, G. Corso⁵¹Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli²Dip. di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università di Foggia³Università Telematica Pegaso. CEINGE- Biotecnologie avanzate, Napoli⁴Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche. CEINGE- Biotecnologie avanzate, Napoli⁵Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Foggia

Background: Cystic fibrosis (CF) is the most common occurring lethal autosomal recessive disorder. The gene defect causes defective sodium and chloride transport across epithelial cells of respiratory, hepatobiliary, gastrointestinal and reproductive tracts, resulting in thick mucus secretions. CF patients suffer of pancreatic exocrine insufficiency, which leads to fat malabsorption, of hepatic steatosis and/or impaired bile acid metabolism. Increased survival rates of CF patients revealed the development of related metabolic alterations in blood, such as abnormal polyunsaturated fatty acid, hypertriglyceridemia, and low cholesterol levels. To date, the homeostasis of cholesterol and non-cholesterol sterols in CF has not been well investigated. Herein we evaluated the whole sterol profile in plasma of CF and unaffected controls.

Methods: Sterol profile analysis was performed in seven CF plasma samples and in twelve age-matched unaffected controls by GC-FID and GC-MS. Besides to cholesterol, we analyzed the levels of lathosterol, a marker of hepatic cholesterol biosynthesis, and of phytosterols as markers of dietary origin (campesterol, stigmasterol, and β -sitosterol), which reflect the rate of sterol absorption.

Results. In CF patients, compared to unaffected controls, we found on average decreased levels of cholesterol (122 vs 154 mg/dL; $p=0.01$), campesterol (0.061 vs 0.329 mg/dL; $p=0.02$), and β -sitosterol (0.150 vs 0.435 mg/dL; $p=0.04$), and increased levels of lathosterol (0.289 vs 0.122 mg/dL; $p=0.002$). These differences were further corroborated measuring the ratio against cholesterol. In CF patients, compared to controls, phytosterols/cholesterol ratio decreased on average threefold ($p=0.004$), whereas lathosterol/cholesterol ratio increased threefold ($p < 0.0001$).

Conclusions. Reduced plasma levels of cholesterol and phytosterols observed in CF may be due to an impaired intestinal absorption of exogenous sterols, which is partially compensated by an increase of hepatic rate of cholesterol synthesis, as showed by the increased lathosterol levels. These preliminary data may suggest that in CF patients there is an impaired homeostasis of cholesterol and non-cholesterol sterols. Further studies should be performed to confirm these findings.

P036

LE VARIANTI DI Hb A2: NUOVE OSSERVAZIONI E POSSIBILITÀ DIAGNOSTICHEG. Barberio¹, D. Leone², A. Citana², G. Ivaldi²¹U.O. Medicina di Laboratorio, Azienda ULSS n.9, Treviso²Lab. di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova

Ad oggi sono state riportate in letteratura 111 difetti che coinvolgono l'espressione del gene delta globinico: 68 producono varianti strutturali mentre 41 sono associate a difetti di "tipo talassemico" che contribuiscono a diminuire o a rendere assente la sintesi delle catene delta; in ogni caso l'effetto prevalente è la diminuita produzione di HbA2 normale. L'importanza di tale effetto è quindi direttamente riconducibile alla diagnosi di beta talassemia essendo l'HbA2 il parametro di riferimento principale per tale condizione genetica. Recentemente nel corso di indagini preconcenzionali, valutando l'assetto emoglobinico ed in particolare l'HbA2 mediante HPLC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ed elettroforesi capillare (Sebia, Paris, France), sono stati osservati comportamenti anomali che lasciavano supporre una alterata produzione di Hb A2. E' proprio l'utilizzo di due diversi metodi separativi che ha consentito di risalire, nell'ultimo anno, alla presenza di varianti dell'HbA2 in 22 soggetti. La successiva analisi molecolare, eseguita mediante sequenziamento diretto dei geni delta globinici, ha permesso di confermare il dato biochimico osservato e di caratterizzare in tre diverse famiglie tre rari difetti, mai descritti nella popolazione italiana: HbA2-Coburg (HBD:c.350G>A, delta 116 Arg>His) (caso1), HbA2-Fitzroy (HBD:c.428C>A, delta 142 Ala>Asp) (caso 2) e HbA2-Lewisburg (HBD:c.359G>A, delta 119 Gly>Asp) (caso 3).

Osservare varianti delle catene delta globiniche rappresenta certamente un evento raro e clinicamente poco rilevante ma è evidente che tali anomalie possono rappresentare un elemento di incertezza e variabilità quando occorre valutare lo stato di portatore di beta talassemia, soprattutto se l'emocromo risulta significativamente alterato. Come per le altre varianti dei geni globinici è bene ricordare che non tutti i difetti strutturali possono essere evidenziati dai mezzi di separazione a nostra disposizione, sia elettroforetici che cromatografici, pertanto nella formulazione di una conclusione degli esami di 1° livello, anche in questi casi, è quindi importante comparare i valori emocromocitometrici e l'assetto marziale con l'assetto quali-quantitativo relativo delle componenti emoglobiniche presenti.

P037

ETEROGENEITA' GENOTIPICA E FENOTIPICA DELL'ANEMIA FALCIFORME NELLA POPOLAZIONE ITALIANA: PERCORSI DIAGNOSTICI

G. Barberio¹, G. Ivaldi²

¹*U.O. Medicina di Laboratorio, Azienda ULSS n.9, Treviso*

²*Lab. di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova*

L'emoglobina S [HbS, beta(A3)6Glu#Val] è la più nota e diffusa variante emoglobinica e la prima ad essere stata descritta e caratterizzata. Dal punto di vista molecolare presenta una transversione GAG>GTG al codone 6 del gene beta-globinico che comporta la sostituzione di un residuo di acido glutammico (Glu) con uno di valina (Val). Sono noti oltre 85 diversi composti emoglobinici nei quali è presente l'HbS in associazione a variazioni puntiformi o delezioni del cluster non-alfa che determinano frequentemente fenotipi clinici importanti. L'HbS è stata descritta anche associata ad almeno 15 varianti delle catene alfa o con difetti alfa talassemici, in questi casi di solito si hanno fenotipi clinici silenti ma che possono produrre composti ibridi complessi rilevabili con i metodi elettroforetici o cromatografici normalmente in uso. Recentemente abbiamo avuto la possibilità di osservare numerosi soggetti eterozigoti e omozigoti HbS o altre combinazioni genetiche associate alla condizione clinica più marcata definita Sick Cell Disease (SCD). Tuttavia sono stati osservati anche composti dell'HbS con difetti globinici che erano capaci di esprimere fenotipi clinici "silenti". Quattro diverse combinazioni sono apparse particolarmente significative per dimostrare come la corretta caratterizzazione, mediante analisi della sequenza dell'intero cluster non-alfa globinico, possa consentire al clinico adeguati approcci terapeutici, corrette valutazioni prognostiche e contribuire, caso per caso ad una consulenza adeguata: HbS + Hb Yoshizuka (caso 1), HbS + Hb Yaizu (caso 2), HbS + HbC (caso 3), HbS + Hb Lepore (caso 4).

Oggi nella popolazione italiana, la crescente eterogeneità di genotipi e fenotipi associati alle emoglobinopatie secondaria ai cambiamenti demografici dovuti ai flussi migratori provenienti dall'Africa e dall'Estremo Oriente, fa osservare composti emoglobinici soprattutto nell'ambito degli screening neonatali. Il laboratorio dedicato alla diagnostica di 1° livello, proprio per la complessità dei quadri eterogenei che si possono incontrare oggi, può trarre maggiori indicazioni utilizzando diversi metodi separativi che potranno, in alcuni casi, meglio orientare verso conclusioni più informative per le fasi diagnostiche successive di 2° livello.

P038

GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF CHOLESTANOL AND PLANT STEROLS IN PLASMA OF UNAFFECTED CHILDREN

F. Papagni¹, M. Gelzo², A. Boscia¹, C. Sica¹, B. La Gatta², M. Gallo¹, A. Dello Russo¹, A. Di Luccia², G. Corso³

¹*Dept. Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples, Federico II*

²*Dept. Science of Agriculture, Food and Environment, University of Foggia*

³*Dept. Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia*

Background: Plasma cholestanol and plant sterols (PS, e.g. β -sitosterol and campesterol) are markers that increase in patients affected by cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) and sitosterolemia, respectively. Furthermore, current works report that plasma levels of cholestanol and PS are positively correlated to cholesterol absorption. Since reference values of cholestanol and PS in children are lacking, this study aims to establish age related reference intervals of cholestanol and PS in plasma of unaffected children.

Methods: Plasma sterol profile was performed in samples from unaffected children aged from five days to 11 years (n=29). Sterols were extracted using an optimized procedure and TMS derivatives were analyzed by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Results: We defined the limits of cholestanol and PS levels between the 2.5th %ile and 97.5th %ile, although in clinical practice the upper limit is mostly of interest. We found that sterol upper limits in group 1 and group 2 were of 0.53 and 0.51 mg/dL for cholestanol, 0.48 and 0.64 mg/dL for campesterol, respectively, and 0.58 mg/dL in both groups for β -sitosterol. Campesterol levels resulted significantly higher in subjects of group 2 compared to group 1 (p < 0.05). Although cholestanol and PS reference values in children are not well established, our values are quite in agreement with those reported in literature. In particular, the upper limits reported for children/adolescent subjects are on average 0.71 mg/dL for cholestanol, 0.89 for campesterol, and 0.42 for β -sitosterol [1-3].

Conclusions: As CTX and Sitosterolemia show similar clinical features, the determination of reference intervals in children are clinically relevant, in addition they are also useful for the study of cholesterol homeostasis in human body. Further studies should be made on a higher number of samples to consolidate our results.

1. van Heijst AF, et al. Eur J Pediatr 1998;157:313-6.

2. Ijzerman RG, et al. Pediatr Res 2002;52:868-72.

3. de Sain-van der Velden MG, et al. J Inher Metab Dis 2008;31(Suppl 2):S387-93.

P039

SCREENING PER LE EMOGLOBINOPATIE NEL BANCAGGIO DEL SANGUE CORDONALE: L'ESPERIENZA FIORENTINA

M. Santosuosso¹, A.L. Caldini², A. Terreni², T. Biagioli², M. Brogi², S. Urbani¹, L. Bianchi¹, A. Bosi³, E. Pelo⁴, F. Torricelli⁵, G. Ivaldi⁶, R. Saccardi¹

¹Banca del Cordone Ombelicale, AOU Careggi, Firenze

²Laboratorio Generale Diagnostica di Laboratorio, AOU Careggi

³Unità Ematologia, AOU Careggi, Firenze

⁴Unità Genetica Medica, Azienda Sanitaria Firenze

⁵Diagnostica Genetica, AOU Careggi Firenze

⁶Laboratorio di Genetica Umana e Microcitemie, Ospedali Galliera, Genova

La Normativa in materia di bancaggio di sangue cordonale a scopo trapiantologico e gli Standard FACT-NetCord per l'accreditamento di eccellenza delle Banche del Cordone Ombelicale stabiliscono che lo screening per le emoglobinopatie sia eseguito prima dell'esposizione delle unità al Registro Italiano Donatori Midollo Osseo e comunque prima di un eventuale rilascio. La tecnica impiegata deve identificare la presenza delle varianti S e C, e quantificare le quote percentuali di HbF e A, indicative nei neonati di condizioni talassemiche.

Indagini su larga scala relative all'assetto emoglobinico neonatale risultano scarsamente disponibili in letteratura, pertanto l'obiettivo del nostro studio è stato di esplorare l'efficacia di un approccio consistente nel sottoporre ad indagine biochimica tutte le unità idonee alla criopreservazione e ad analisi molecolare solo quelle con assetto non rientrante nei range di normalità prestabiliti.

Dal 2006, sono state testate 1323 unità. Il profilo emoglobinico è stato ottenuto mediante tecnica HPLC (Variant II, Dual kit, Biorad).

L'analisi della distribuzione delle percentuali di HbA ha permesso di definire una quota >12% (97,5esimo percentile) in associazione all'assenza di emoglobine varianti, come una condizione di normalità; mentre valori 5-12% e ≤5% compatibili con un quadro talassemico in etero o omozigosi rispettivamente.

I risultati dell'analisi genetica su 29 campioni positivi (HbA <9%, cutoff emerso dall'analisi statistica eseguita sui dati disponibili al 2011, e/o presenza di Hb varianti e/o anamnesi familiare positiva) al primo livello sono stati: 2 portatori eterozigoti di HbS, 1 beta-talassemia major (raccolta autologa), 10 portatori eterozigoti di beta-talassemia, 1 portatore eterozigote di Hb G St. Josè, 2 analisi non concluse, 12 esiti negativi (relativi a sospette beta talassemie in eterozigosi) e un caso con diagnosi prenatale di portatore eterozigote di beta talassemia con HbA=13%.

L'analisi retrospettiva ha mostrato come la tecnica HPLC sia idonea all'individuazione di assetti emoglobinici compatibili con condizioni patologiche che necessitano di una indagine genetica; inoltre, i risultati emersi contribuiranno alla standardizzazione delle procedure di screening nel bancaggio del sangue cordonale.

P040

REFERENCE VALUES OF ERYTHROBLASTS OF UMBILICAL CORD BLOOD: ANALYSIS OF RESULTS

F. Dima¹, R. Raffaelli³, S. Cascella³, M. Montagnana², M. Meneghello¹, M. Franchi³, G. Lippi⁴, G.C. Guidi²

¹Lab. Analisi UOC, AOU Verona

²Sez. di Biochimica Clinica, Dip. Di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona

³Sez. Ginecologia e Ostetricia, Dip. Di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona

⁴Unità Operativa Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Introduction: Nucleated red blood cells (NRBC) are present in modest number in the cord blood of healthy babies at birth. Several acute and chronic stimuli are capable of stimulating erythropoiesis, thus triggering a sudden release of NRBC by the bone marrow pool. The peak of circulating NRBC is reached ~24 h after the stimulus. This study is aimed to define NRBC reference values for cord blood of healthy newborns to be used as predictive test of hypoxic-ischemic brain damage.

Materials and methods: The NRBC counting was performed on samples obtained from the venous umbilical cord blood of healthy infants with birth weight > 2500 g and umbilical arterial pH > 7.1. The analysis was performed using Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The reference interval was defined with non-parametric approach, as indicated in the CLSI document C28-A3, using Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK).

Results: Three out of 333 cord blood samples received were excluded due to clotting. The median value of NRBC count was found to be $0.44 \times 10^9/L$ (reference range, $0.03-2.49 \times 10^9/L$) or 3.1 % (reference range, 0.3-14.2%). The verification test for normality revealed a non-Gaussian distribution for both.

Conclusions: The appearance of neurological complications after hypoxic especially in infants without conventional risk factors is a crucial forensic issue. The NRBC counts in umbilical cord blood hence could be used as a surrogate marker of intrauterine hypoxia to help differentiate the intrapartum from prepartum injury, provided that an accurate reference range is available.

P041

SOSPETTO DIAGNOSTICO DI MALARIA CON L'ANALIZZATORE SYSMEX XE-2100

C. Oliviero, L.C. Iordache, L. Betti, P. Casprini

Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Osp. S.Stefano, USL4 Prato

Introduzione: L'intensificarsi del fenomeno migratorio insieme all'aumento dei viaggi internazionali ha determinato un aumento dei casi di malaria anche nei paesi non endemici. In questo lavoro riportiamo 4 casi di malaria (due da *P.Vivax* e due da *P.Falciparum*) diagnosticati incidentalmente con l'analizzatore ematologico Sysmex XE-2100

Metodi: I pazienti, tutti immigrati (Asia-Africa) di entrambi i sessi e con una fascia di età compresa tra i 15 mesi e i 53 anni, sono giunti al DEU del nostro presidio ospedaliero con sintomi aspecifici e sottoposti ai comuni esami di chimica clinica, emocromo, coagulazione e in un caso anche ad esami sierologici (epatite A-B-C, CMV, EBV, sierodiagnosi per tifo, paratifo e brucella) ma in nessun caso, dalla sintomatologia, era nato il sospetto diagnostico di malaria.

Lo strumento utilizzato per l'esame dell'emocromo è il Sysmex XE-2100 (Dasit S.p.A.-Milano)

Risultati: In due casi abbiamo avuto una pseudo-eosinofilia e in uno anche una piastrinopenia, l'analisi del canale DIFF ha mostrato uno sdoppiamento del cluster degli eosinofili ma la successiva revisione microscopica ha escluso l'eosinofilia ed ha evidenziato la presenza di un *P. Vivax* con una parassitemia rispettivamente dello 0.2% e dello 0.3%. La pseudo-eosinofilia sarebbe riconducibile alla presenza di emozoina all'interno delle cellule ma anche alla presenza dello schizonte e delle forme gametocitiche che scatterizzano in corrispondenza del cluster degli eosinofili.

In altri due casi abbiamo avuto una piastrinopenia associata all'allarme Atypical Lympho e solo in un caso una marcata anemia normocromico-normocitica. L'analisi del canale DIFF non ha evidenziato alterazioni del cluster degli eosinofili ma solo una caratteristica distribuzione a fiamma nella zona dei linfo-monociti. La revisione microscopica ha messo in evidenza la presenza di numerosi trofozoiti di *P.falciparum* con una parassitemia rispettivamente del 10% e del 14%

Conclusioni: L'utilizzo di una strumentazione ematologica di comune impiego ha favorito la rapidità della diagnosi, consentendo un precoce inizio della terapia.

Capizzi B, Suppi R, Graziani MS. *Biochim Clin* 2012;36:204-8.

Giacomini A, Miolo M, Afshar H, et al. *Biochim Clin* 2012;36:209-10.

P042

UNA SEPSI DA S.AUREUS ED UNA CANDIDOSI SISTEMICA DIAGNOSTICATI INCIDENTALE NEL SETTORE DI EMATOLOGIA: COLLABORAZIONE CON LA MICROBIOLOGIA

C. Oliviero, L.C. Iordache, L. Betti, R. Degl'Innocenti, T. Brunelli, A. Conti, P. Casprini

Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Osp. S. Stefano, USL4 Prato

Introduzione: L'infezione ematica costituisce una grave complicanza nei pazienti immunodepressi, spesso causa di morte. In questo lavoro riportiamo due differenti casi di sepsi diagnosticati incidentalmente nel settore di Ematologia e che ha visto la successiva collaborazione dei colleghi di Microbiologia. Lo strumento utilizzato per l'esame dell'emocromo è il Sysmex XE-2100 (Dasit S.p.A.-Milano)

Metodi: Nel primo caso, una paziente 40'enne oncologica esegue esami di routine per controllo. L'esame dell'emocromo segnala una serie di flags (PLT clumps, Left Shift, NRBC), viene eseguita la revisione microscopica dello striscio che mette in evidenza la presenza di numerosi batteri intraleucocitari che sembrano mimare i diplococchi.

Il secondo caso riguarda un paziente 80'enne ricoverato nel reparto di terapia sub intensiva. L'esame dell'emocromo segnala analoghi flag e un'anomalia nel canale Baso, lo striscio evidenzia la presenza massiva di spore di miceti con una distribuzione intra ed extracellulare

Risultati: Sui campioni ematici vengono eseguiti gli esami colturali e i relativi antibiogrammi dai colleghi della Microbiologia che evidenziano, nel primo caso la presenza di uno *Staphylococcus Aureus* e nel secondo una *Candida Parapsilosis*

Conclusioni: La rapidità di una diagnosi microbiologica è alla base di una pronta e mirata terapia chemioantibiotica e la stretta collaborazione fra settori diversi del laboratorio può diventare essenziale per un veloce intervento terapeutico. Purtroppo, nel primo caso, non siamo riusciti a salvare la paziente che è deceduta dopo 2 giorni a seguito delle complicanze della neoplasia (melanoma metastatico).

D'Onofrio G, Zini G. *Morfologia delle malattie del sangue*. Verduci Editore 2013:701-40.

Bain B. *Blood Cells*. Wiley Blackwell 2015:148-71.

P043

ANTI-PLATELET FACTOR 4 ANTIBODIES IN ABSENCE OF HEPARIN ADMINISTRATION IN PATIENTS AFFECTED BY SEPSIS

G. Lobreglio, M. Greco, A. Longo, S. Lucia, F. Miglietta

U.O. Patologia Clinica, P. O. "Vito Fazzi", ASL Lecce

Background and aim: In a variable percentage of patients treated with heparin the immune system produces antibodies against epitopes of platelet factor 4 (PF4) complexed with heparin, which are able to induce thrombocytopenia, activate platelets and determine an hypercoagulable state with venous and arterial thrombosis in different districts (HIT). Anti-PF4 antibodies (PF4-Ab) however, can be produced in absence of heparin, by not fully understood mechanism. In the present study we evaluated PF4-Ab production in patients with sepsis by gram-negative bacteria, whose cell wall is rich of polyanions able to complex PF4 and potentially trigger PF4-Ab synthesis.

Materials and methods: We analyzed 33 patients hospitalized in various Units of Lecce "V. Fazzi" Hospital with sepsis by gram-negative bacteria and positive blood culture for *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Neisseria meningitidis*, *Serratia marcescens* and 10 patients from same Units without any sepsis. PF4-Ab were searched in citrate plasma of analyzed patients by fully automated latex enhanced immunoassay (HemosIL HIT-Ab, Instrumentation Laboratory) on ACL TOP system.

Results: PF4-Ab were detected in 7 out of 33 patients with sepsis (21%) with positive range between 1.6 and 3.5 Arbitrary Unit U/mL (95% of donors showing a range 0-0.6 U/mL) and was absent in 10 patients without sepsis with range between 0.3 and 0.7 U/mL.

Discussion and conclusions: The present study demonstrated the PF4-Ab production in about one fifth of patients affected by sepsis from gram negative bacteria, in absence of heparin administration; according to recent scientific evidence (Warkentin et al Blood 2014;123:3651-3654), PF4-Ab production can be induced by PF4 binding to polyanions of bacterial cell wall because of an ancient defense mechanism against microbes; such antibodies can cross react with PF4/heparin complex on platelet surface and induce early or late or spontaneous HIT. Functional activity of these antibodies is under evaluation by a cytofluorimetric test of platelet activation based on CD62p expression and microparticles formation in donors platelets stimulated with patients plasma.

P044

UN CASO DI UN PAZIENTE CON FEBBRE, DISPNEA, PANCITOPENIA E LESIONE CUTANEA AL PIEDE SINISTROV. Russo¹, F. Ferrara², M. Celentano², M. Annunziata², O. Finizio²¹Dip. Ematologia, A.O.U. Federico II, Napoli²U.O. di Ematologia, A.O.R.N. A. Cardarelli, Napoli

Obiettivi: Si stima che in Europa la leucemia mieloide acuta (LMA) abbia un'incidenza di 3-5 nuovi casi/100.000 individui per anno con un picco di 13-15 nuovi casi/100.000 individui intorno alla sesta-settima decade di età. Descriviamo un caso di LMA in un paziente di 70 anni con dispnea, febbre, pancitopenia e lesione cutanea al piede sinistro.

Metodologia: Un uomo di 70 anni giunse alla nostra osservazione ad ottobre 2014 per dispnea, febbre, pancitopenia e lesione cutanea al piede sinistro.

Una TAC del torace evidenziava a livello del lobo polmonare inferiore sinistro e destro alcune aree di addensamento parenchimale; piccole bolle di enfisema parasettale e centrolobulare d'ambo i lati, più diffuse ai lobi superiori.

Venivano eseguiti esami biochimici che risultavano nella norma tranne per Hb 9,2 g/dl; G.B. 1200/μl (neutrofili 750/μL, linfocitosi relativa); G.R. 3.150.000/μl; piastrine 17.000/μl; LDH 725 U/L; VES 32 mm; albuminemia 2,3 g/dL.

Un tampone faringo-tonsillare risultava positivo per *Candida parapsilosis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Un tampone della lesione cutanea documentava la presenza di *Cunninghamella* spp (Zygomycete) e *Candida albicans*. L'esame morfologico dello striscio di sangue periferico confermava la leucopenia associata ad una neutropenia e linfocitosi relativa.

L'aspirato midollare documentava la presenza di una quota di elementi blastici mieloidi pari al 70%. I dati ottenuti permettevano di porre diagnosi di LMA con associata infezione da Zygomycete, *Klebsiella pneumoniae* e del genere *Candida*.

Risultati: Il paziente iniziava terapia antibiotica con meropenem e amfotericina B ottenendo rapidamente un miglioramento della dispnea e della febbre.

Considerazioni conclusive: La LMA può presentarsi clinicamente come emergenza medica; per effetto dell'insufficienza midollare si instaura una condizione di neutropenia tale da esporre i soggetti a maggior rischio di infezioni batteriche e/o fungine.

L'identificazione precoce nella diagnosi di LMA con associata infezione da Zygomycete, *Klebsiella pneumoniae* e del genere *Candida* permette un più rapido trattamento e miglioramento della sintomatologia iniziale.

1. Zuckerman CG, Tallman MS, Rowe JM. How I treat hematologic emergencies in adults with acute leukemia. Blood 2012;120:1993-2002.

P045

CASO CLINICO

D. Tanca, O. Figari

Lab. Analisi, Osp. Lavagna ASL4 Chiavarese

Un ragazzo di 17 anni si presenta di sabato pomeriggio al pronto soccorso per dolori ossei diffusi. Gli esami di laboratorio evidenziano una severa anemia, piastrinosi, leucocitosi, reticolocitosi, LDH elevato, aptoglobina bassa, test di Coombs diretto ed indiretto negativi; azotemia, creatinina e transaminasi nella norma; striscio periferico: anisopoichilocitosi, presenti alcune emazie falciformi, numerose emazie a bersaglio, alcuni cheratociti, numerosi corpi di Howell-Jolly, 5% di eritroblasti ortocromatici. Orientamento diagnostico: anemia emolitica in probabile emoglobinopatia (Hb SC? Hb SS?). In corso studio assetto emoglobinico e G6PDH. Assetto Hb: HbSS; deficit di G6PDH.

Diagnosi: crisi dolorosa acuta in pz con drepanocitosi (HbSS) e deficit di G6PDH

Inviato d'urgenza dopo due giorni di ricovero al Centro delle Microcitemie Ospedale Galliera.

Anemia falciforme o drepanocitosi (omozigosi Hb S) è la più comune emoglobinopatia nel mondo, è poco conosciuta nel nostro paese, è una patologia complessa sistemica con ampia eterogeneità clinica, con episodi di acuzie e progressivo danno d'organo.

Ipotesi produce deossi-HbS insolubile con danno della membrana del globulo rosso, emolisi cronica e microtrombi nei capillari.

P046

CASO CLINICO

D. Tanca, O. Figari

Lab. Analisi, Osp. Lavagna ASL4 Chiavarese

Donna di 28 anni, ambulatoriale esterna alla 32 settimana di gravidanza, con anemia, piastrinopenia e severa neutropenia; no allarme blasti strumentale.

Striscio periferico:

20% di blasti agranulati CD34+, CD117+, CD33+, cMPO +.

Segue pannello di approfondimento.

Confermata piastrinopenia.

Orientamento diagnostico: LAM.

Contattato medico di base, fatto fax referto, inviata urgentemente in Ematologia (Genova).

Confermata LAM, cariotipo normale, NPM1 mutato?

Caratteristico è il quadro morfologico.

La Sig.ora ha partorito dopo due settimane e successivamente è stato eseguito il trapianto.

Attualmente è in recidiva.

P047

CONFRONTO TRA CITOFUORIMETRO AQUIOS CL E FACSCanto II: DATI PRELIMINARI

C. Oliviero, L.C. Iordache, L. Betti, B. Lucherini, P. Casprini

Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia. Osp. S.Stefano, USL4 Prato

Introduzione: Il citofluorimetro AQUIOS CL (Beckman Coulter) consente l'analisi quantitativa delle sottopopolazioni linfocitarie con un concetto "Load & Go". Al pari di un contaglobuli automatizzato, Aquios dispone di un sistema completamente integrato con: caricamento automatico, preparazione del campione, gestione dei reagenti, scansione dei codici a barre e analisi dei dati. L'algoritmo Aquios Tetra combina le informazioni di diversi parametri (FS, SS, Fluorescenza e volume elettronico) generando automaticamente gate e regioni per identificare i linfociti e separarli nei rispettivi componenti. Attualmente si tratta di un sistema "chiuso" che consente solo l'esecuzione di test preconfigurati dalla ditta nel futuro permetterà di creare applicazioni automatiche decise dal cliente. In questo lavoro preliminare riportiamo la comparazione tra questo nuovo sistema e il FACS Canto II (BD), attualmente in uso nel nostro laboratorio

Metodi: Durante il periodo di valutazione strumentale, su 79 soggetti, sono state studiate le sottopopolazioni linfocitarie CD3, CD4, CD8, Ratio CD4/CD8, CD19 e NK sia su Aquios (pannelli anticorpali Tetra-I e Tetra-Combo) sia su FACSCanto II (pannelli Multitest 4-color e 6-color), ogni seduta ha previsto anche l'utilizzo del rispettivo controllo di qualità (Aquios Immuno-Trol e BD Multi-Check Control)

Risultati: I risultati di correlazione secondo Pearson e regressione lineare sono risultati statisticamente significativi per le popolazioni studiate con $r = 0.987$ (usato il Pacheging statistico SPSS) significative anche le curve di comparazione secondo Bland e Altman.

Conclusioni: Su Aquios il concetto "Load & Go" è pienamente soddisfatto, i risultati del primo campione si ottengono dopo circa 20-25 minuti dal caricamento, i risultati successivi si ottengono ogni 2-3 minuti. I dati, per quanto preliminari, non lasciano dubbi sull'efficacia ed efficienza di questa soluzione operativa.

P048

CASO CLINICO

D. Tanca, O. Figari

Lab. Analisi, Osp. Lavagna ASL4 Chiavarese

Signora di 81 anni, ambulatoriale esterna con anemia macrocitica e neutropenia, piastrine nella norma; allarme strumentale MDS.

Striscio periferico: anisopoichilocitosi, presenti macro/megalociti, alcune emazie a goccia; confermata neutropenia, alcuni neutrofili ipogranulati. rari megatrombociti. Utili indagini di secondo livello.

Aspirato midollare: campione pervenuto con piccoli frustoli, marcatamente ipercellulare. Severa iperplasia della serie eritroide, presente diseritropoiesi ed isolotti eritrocitati. Serie mieloide maturante. Megacariociti aumentati di numero, numerose le forme iposegmentate (del5q?). Blasti <3%, corpi di Auer assenti. Reazione di Perls negativa.

Per un corretto inquadramento diagnostico secondo classificazione WHO valutare citogenetica.

Laboratorio di citogenetica oncoematologica:

CARIOTIPO: 46,XX [3]/46XX,del(5)(q13q31)[10].

Conclusioni: la maggioranza delle metafasi analizzate presentano cariotipo femminile con la delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 5 (5q-).

Diagnosi: sindrome mielodisplastica associata a del(5q)isolata.

P049

CASO CLINICO

D. Tanca, O. Figari

Lab. Analisi, Osp. Lavagna ASL4 Chiavarese

Uomo di 80 anni; nel 2010 gli fu diagnosticato un SLVL. In ottobre 2011 si presenta in ambulatorio con spiccata anemia, piastrinopenia e modesta leucocitosi.

Striscio periferico, aspirato midollare e biopsia osteomidollare confermano un infiltrato di blasti di grandi dimensioni, morfologicamente indifferenziati; l'immunofenotipo li identifica come blasti mieloidi (CD34+,CD33+,cMPO+.

Biopsia osteomodollare conferma l'infiltrato di blasti mieloidi.

Citogenetica: cariotipo 90, XXYY, COMPLESSO; cariotipo "near tetraploide" con numerosi riarrangiamenti numerici e strutturali (ad esempio duplicazione parziale del braccio lungo di un cromosoma 1).

Diagnosi: Leucemia Acuta Mieloide con differenziazione minima (già FAB M0).

P050

CASO CLINICO

D. Tanca, O. Figari

Lab. Analisi ,Osp. Lavagna, ASL4 Chiavarese

Uomo di 61 anni; nel 2006 diagnosticata LMC Ph+, in terapia con Glivec, in remissione. Emocromo di novembre 2009 leucociti, globuli rossi e piastrine con valori nella norma, ma allo striscio periferico si evidenzia la presenza di un 40% di blasti morfologicamente indifferenziati con il seguente immunofenotipo:

CD45low, CD34+, CD33+, CD13+low, cMPO-, CD19+, HLA-DR+, CD38+, CD10+/-, CD20-, CD25+, CD22-, CD2-, CD7-, CD5-, CD14-, CD16-, CD36-, CD56-.

Aspirato midollare: 80% di blasti con stesso immunofenotipo.

Analisi molecolare del gene BCR/ABL: valore BCR-ABL/ABLx quantitativo:33.85% .

Analisi mutazionale del gene Abl: nessuna evidenza di mutazione puntiforme.

Cariotipo: 46,xy,t(9;22)(q34,q11),-7.+ring.

Conclusioni: tutte le metafasi analizzate presentano oltre il cromosoma Ph, monosomia del cromosoma 7 ed un ring di probabile derivazione del 7.

Conclusioni diagnostiche:

LMC in evoluzione blastica da probabile trasformazione di una cellula progenitrice multipotente Leucemia "ibrida", "ambigua", con blasti mieloidi e linfoidi, o LAL?

Terapia con dasatinib, poi chemioterapia e trapianto.

P051

VALORI DI RIFERIMENTO PER LE PIASTRINE E LE PIASTRINE RETICOLATE NEL SANGUE DEL CORDONE OMBELICALE.

F. Dima¹, R. Raffaelli², S. Cascella², M. Montagnana³, M. Meneghello¹, M. Franchi², G. Lippi⁴, G.C. Guidi³

¹Lab. Analisi dU, AOUI Verona

²Sez. di Ginecologia e Ostetricia, Dip. di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona

³Sez. di Biochimica Clinica, Dip. di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona

⁴U. O. Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Scopo del lavoro: La trombocitopenia è uno dei più comuni disordini ematologici che si possono riscontrare in terapia intensiva neonatale (TIN), coinvolgendo secondo la più recente letteratura fino al 35% di tutti i neonati ricoverati in questo reparto. Scopo di questo studio è la definizione dei valori di riferimento per piastrine e piastrine reticolate nel sangue del cordone ombelicale.

Materiali e metodi: Il conteggio delle piastrine e della frazione immature (IPF) è stato eseguito su campioni di sangue venoso di cordone ombelicale di neonati sani, con peso alla nascita >2500 g, pH arterioso ombelicale >7.1. L'analisi è stata eseguita su Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Gli intervalli di riferimento per IPF e la conta piastrinica sono stati definiti con un approccio non parametrico, secondo le indicazioni del documento CLSI C28-A3, utilizzando Analyse-it (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK).

Risultati: Su un totale di 243 campioni pervenuti, 3 sono stati esclusi poiché coagulati. La valutazione si è quindi basata su 240 campioni. Si è ottenuta una mediana della conta piastrinica pari a $295 \times 10^9/L$ (intervallo di riferimento, $139-437 \times 10^9/L$) ed una mediana di IPF pari a 2.7% (intervallo di riferimento, 1.3-8.5%). Il test di verifica della normalità ha rivelato una distribuzione di tipo normale per le piastrine ed una distribuzione non gaussiana per IPF.

Conclusione: I valori della conta piastrinica e delle piastrine reticolate possono essere un valido sistema per l'identificazione di piastrinopenie di natura iporigenerativa o periferiche neonatali. In aggiunta ad altri parametri dell'emocromo, conta piastrinica ed IPF consentono di ottenere un quadro più completo sullo stato di salute del neonato ricoverato in TIN.

P052

A CASE OF PANCYTOPENIA CAMOUFLAGING ACUTE MYELOID LEUKEMIA

P. Piccioni¹, F. Pauselli², R. Pica², G. Pitucco³, C. Sighieri³, G. Greco¹, M. Parakadan¹, M.L. Gozzo¹

¹Lab.di Patologia, Osp. MG Vannini, Roma

²Lab.di Citofluorimetria, Osp. San Giovanni Addolorata, Roma

³Med. d'urgenza, Osp. MG Vannini, Roma

Pancytopenia is defined by reduction of all the main three peripheral blood cells below the normal reference. It may be a manifestation of a wide variety of disorders, which primarily or secondarily affect the bone marrow. Haematological investigation forms the bedrock in the management of patients with pancytopenia and therefore needs detailed study. We illustrated a case report of a female 82 years old affected by a suddenly severe pancytopenia associated with low fever and extreme asthenia. ADVIA 2120 hematology analyzer showed: HGB 7.7gr/dl, MCV 106.5fl, WBC 1100/mmc, Neut 700 /mmc, Lymph 400/mmc, Mono 100/mmc, Plt 7000/mmc, LUC 0.02/mmc and alarm for blasts(++). Coulter xH800 counter showed results in line with ADVIA, except for a lower count of WBC and no alarm for blasts. At peripheral blood film significant increase of blasts' count wasn't seen without evidence of morphological dysplasia. Further investigations showed LDH 394 UI/ml; direct Coombs test negative; reticulocytes 1.4%; acid uric 10.4mg/dl; ferritin 257ng/ml; folic acid 7.6 ng/ml; vitamine B12 312 pg/ml. A bone marrow aspirate was performed, showing normal cellularity and diverse frustules with 39% of myeloid blasts peroxidase negatives. Cytofluorimetric analysis reported: 16000/mmc nucleated cells with 33% of myeloblasts with minimal signs of differentiation with positivity for CD45dim, CD117, CD33, CD 13, CD34 HLA-DR. AML with minimal myeloid maturation diagnosis was done. Pancytopenia is a relatively common entity with inadequate attention in general hospital. A comprehensive clinical and haematological study of patients with pancytopenia will usually help in the identification of the underlying cause. However, in view of wide array of aetiologies, pancytopenia continues to be a diagnostic challenge for haematologists. Moreover it can hide an acute myeloid leukemia. Also in absence of increase blast's peripheral count, a bone marrow examination was able to establish diagnosis with counting and identification of medullar blasts and define features of dysplastic morphological alterations in all three cell lineages. AML in older patients presents a notable therapeutic challenge to the clinical hematologist considering the highly heterogeneous clinical biology of AML among patients and interpatient variations are also relevant for prognosis and treatment.

P053

LIGHT CHAIN ESCAPE IN A PATIENT WITH MULTIPLE MYELOMA TREATED WITH NOVEL AGENTS

G. Antolino¹, A. Tafuri¹, M.P. Bianchi¹, P. Cardelli², G. La Verde¹

¹UO Ematologia, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Università Sapienza di Roma

²UO Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Università Sapienza di Roma

The serum free light chain (sFLC) assay is an important tool in the management of patients with monoclonal gammopathies. FLC measurement is used in the assessment of the risk of progression of precursor diseases to overt myeloma, and for risk stratification in solitary plasmacytoma, multiple myeloma (MM) and AL amyloidosis. In patients with oligosecretory myeloma and AL amyloidosis, the quantification of sFLC is essential for monitoring and categorization of response to therapy. Serum FLC concentrations also correlate with disease course in the majority of MM patients and have been incorporated into the new response criteria: the definition of stringent complete response (sCR) requires the presence of a normal sFLC ratio in addition to other criteria.

We report a case of a 58 years-old female patient with multiple myeloma (IgA κ) who received autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) after induction with 6 cycles of BOR/DEX and 4 cycles of LEN/DEX in October 2010, and obtained a sCR. Disease assessment and monitoring was made by the association of the FLC assay (Freelite™ – The Binding Site Ltd, Birmingham,UK) with the traditional serum tests. In May 2012, despite serum tests and bone marrow were normal, FLC- κ showed a rapid increase and after 1 month she presented a sternal swelling. Then, local radiotherapy and treatment with LEN/DEX were started. After 9 cycles of LEN/DEX, IgA decreased but FLC- κ increased paradoxically, indicating a clonal change. In March 2013, an LCD regimen was started and after 6 cycles, IgA showed normalization, but her condition worsened as FLC- κ increase.

Novel therapy options in MM allowed to improve treatment outcome. However, disease evolution, induced with long disease duration and extensive treatment, has resulted in changes in the biological behavior of MM and different relapse events, such as extramedullary disease or a shift in secretion from intact immunoglobulin to FLC only. This case showed a clinical course with light chain escape followed by rapid disease progression. Our report suggests that early light chain escape by means of serial sFLC measurements allows to detect unusual relapse manifestations and may improve clinical course in MM patients.

P054

IMPORTANZA DI ESAMI BIOUMORALI SERIATI NEL FOLLOW-UP DI GAMMOPATIE MONOCLONALI DI INCERTO SIGNIFICATO (MGUS) : PROPOSTA DI UN WORK-UP PROGNOSTICO

M.C. Stanzola, G. Mattered, M.C. Monti, R. Iaccarino, A. Castagliuolo

U.O.C. Patologia Clinica, P.O. Anna Rizzoli, Lacco Ameno Napoli

Background: Il riscontro occasionale di un picco monoclonale all'elettroforesi delle proteine rappresenta un evento frequente in soggetti asintomatici di età ≥ 50 anni. Le attuali linee guida raccomandano uno stretto monitoraggio dei pazienti MGUS per valutare la prognosi e la progressione di malattia attraverso l'impiego di metodiche invasive come la biopsia midollare.

Scopo: Lo scopo del nostro studio è stato quello di utilizzare esami bioumorali seriati per valutare il tempo alla progressione di malattia in pazienti MGUS.

Materiali e Metodi: 116 pazienti (63M) età media 67° (range 35-87a) con diagnosi di MGUS dal riscontro di componenti monoclonali all'immuno-elettroforesi delle proteine furono seguiti per un periodo di circa 10 anni dal 2004 al 2014. 81 paz (70%) avevano una componente monoclonale IgG, 28 (24%) una componente IgA, 4% (5 paz) una proteina biclonale IgM e 2 (2%) una malattia da catene leggere. Il flusso di controllo (flow chart) adottato dal nostro Lab prevede dosaggio della calcemia, creatinina, emocromo completo ed elettroforesi delle proteine sieriche (SPEP) ed urinarie (UPEP) ad intervalli regolari in base ai livelli di picco monoclonale tra 1.5 g/dl e 3 g/dl. In presenza di un basso livello di picco monoclonale (<1.5 g/dl) i test raccomandati SPEP, UPEP, dosaggio delle catene leggere libere nel sangue venivano eseguiti ogni 4 mesi per 2 anni e poi una volta l'anno in assenza di segni di progressione di malattia; paz con CM >1.5 g/dl effettuavano un follow-up ogni 6 mesi e paz con CM IgA o IgM o con CM tra 1.5 e 3 g/dl effettuavano dosaggio $\beta 2$ microglobulina sierica, LDH e PCR.

Risultati: Il follow up dei 116 paz MGUS eseguito in base al work up validato, ha consentito la diagnosi di MM in 25 pazienti (22%) sulla scorta di modificazioni bioumorali in particolare di progressivi incrementi della calcemia e della creatinemia oltre che di improvvisi incrementi sierici dei livelli della CM. I livelli di $\beta 2$ microglobulina e di LDH correlavano significativamente con la progressione di malattia.

Conclusioni: In pazienti MGUS asintomatici e con livelli intermedi di CM (>1.5 e < 3 g/dl), la biopsia midollare potrebbe essere evitata con un attento e mirato work up diagnostico.

P055

RISULTATI PRELIMINARI SULLA MISURA DELLE HEVYLIGHT® IN PAZIENTI CON MIELOMA MULTIPLO SOTTOPOSTI A TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI

M. Berardi¹, M. Staderini², A. Terreni¹, C. Nozzoli², T. Biagioli¹, M. Brogi¹, V. Ercoli¹, A. Moscarella¹, L. Reggiani¹, A. Bosi², A. Caldini¹

¹Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

²Ematologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

L'approccio terapeutico di elezione per pazienti con mieloma multiplo (MM) di età <65 anni e privi di comorbidità importanti è il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT).

In seguito a ASCT è frequente riscontrare all'immunofissazione (sIFE) la comparsa di quadri oligoclonali che avrebbero un valore prognostico positivo in quanto indicativi di ricostituzione del repertorio midollare (1). Allo stesso modo, lo sbilanciamento del rapporto HLC (Hevylight®, The Binding Site, UK) a favore dell'isotipo κ delle immunoglobuline non coinvolte, avrebbe un impatto prognostico positivo (1). Presentiamo i dati preliminari relativi ad uno studio sull'utilizzo del test HLC nella valutazione della ricostituzione immunologica in 4 pazienti con MM (2 IgG λ , 1 IgG κ e 1 IgAk) sottoposti a ASCT. Al tempo 0, dopo 1, 3, 6, 9 e 12 mesi da ASCT è stata effettuata l'immunofissazione sierica (sIFE; Hydrasis, Sebia, Italia) e misurato il rapporto HLC (rHLC). Analizzando i risultati rispetto all'intervallo di riferimento, solo 7/20 campioni hanno fornito un risultato di rHLC sbilanciato verso le κ per le IgM, mentre per IgA e IgG sono risultati tutti al di sotto del limite superiore. Utilizzando invece il valore mediano come proposto da altri AA (1), la % di campioni positivi risulta circa del 50% per tutte le classi di Ig. È interessante notare come i valori mediani ottenuti nella nostra casistica siano sovrapponibili a quelli ottenuti da Bradwell (2), come riportato anche da Tovar (1). La % di concordanza con la presenza di quadro oligoclonale alla sIFE è risultata rispettivamente 29% e 24 % per IgA e IgM, mentre per le IgG nell'unico paziente con MM non IgG è risultata del 50%. La scarsa concordanza tra sIFE e rHLC potrebbe far supporre che i due test forniscano informazioni diverse dal punto di vista biologico. I risultati preliminari di questo studio confermano i dati di Tovar rispetto all'utilizzo del valore mediano come corretto approccio statistico. La conferma dell'utilità prognostica di HLC nei pazienti sottoposti a ASCT sarà possibile solo a studio ultimato su un adeguato numero di pazienti.

1. Tovar N, et al. Biol Blood Marrow Transplant 2012;18:1076-9.

2. Bradwell AR. In: Serum Free Light Chain Analysis /plus Hevylight). Birmingham, UK: Binding Site, 2010:301-19.

P056

VELOCITA' DI ERITROSEDIMENTAZIONE: NUOVI VALORI DI RIFERIMENTO PER UN ESAME ANTICO

R. Marozzi¹, G. Catanoso²

¹A.O. Chiari (BS), Laboratorio Analisi, P.O. di Iseo

²A.O. Chiari (BS), Laboratorio Analisi, P.O. di Chiari

La velocità di eritrosedimentazione (VES) costituisce ancora oggi un test frequentemente richiesto, perché semplice e a basso costo, nonostante per il clinico sia un indicatore senza un'adeguata specificità diagnostica. Invece in ambito laboratoristico è ancora dibattuta l'esatta definizione dei valori di riferimento.

Vari sono stati gli autori che hanno cercato di individuare i limiti di riferimento tramite analisi statistiche o proponendo algoritmi basati su altri dati, in particolare l'età del paziente.

Scopo del lavoro è stato quello di rivalutare in loco i limiti di riferimento di normalità della VES.

Tramite analisi retrospettiva sono stati estratti dall'archivio i risultati della VES dei pazienti ritenuti di riferimento in modo arbitrario sulla base della normalità di Hb, MCV, LDH e proteine totali.

La determinazione della VES era stata eseguita su VESMATIC CUBE 200 Dicese, Hb e MCV su ADVIA 2120 Siemens, LDH e PT su COBAS Roche.

I 601 dati elaborati (range età 11-94 anni) hanno permesso di individuare: una correlazione non significativa tra valore della VES ed età (r 0,301), ma una diversa regressione lineare tra maschi e femmine.

L'analisi per classi d'età in decenni ha evidenziato che il limite percentile superiore presenta un aumento all'aumentare della classe d'età, con una variazione significativa tra le classi d'età della quarta e quinta decade.

Si può quindi concludere che lo studio effettuato sembra indicare l'opportunità almeno di una suddivisione per classi d'età del valore di riferimento di normalità della VES, rispetto all'attuale sola indicazione per sesso (m. 10 mm, f. 15 mm).

È invece necessario aumentare la numerosità dei dati per eseguire un approfondimento con la valutazione per classi d'età e per sesso.

P057

CORRELAZIONE TRA LA FORMULA DIFFERENZIALE AL MICROSCOPIO OTTICO E QUELLA PRODOTTA DALL'ANALIZZATORE ADVIA 560 SIEMENS: VALUTAZIONE PRELIMINARE

M. Fumi, Y. Pancione, S. Sale, V. Rocco

U.O.C. Patologia Clinica, AORN G. Rummo, Benevento

L'ADVIA 560 (Siemens) è un sistema ematologico completamente automatico, destinato all'uso diagnostico in vitro. Esso utilizza il metodo dell'impedenza per la misura di WBC, RBC e PLT, la fotometria per la determinazione dell'emoglobina ed una tecnologia ottica basata sulla citometria a flusso a luce laser diffusa per la formula differenziale. L'analizzatore opera aggiungendo ad un campione di sangue intero del diluente ed un reagente di lisi: il Lyse5P che degrada RBC e PLT. La successiva aggiunta di Diff5P impedisce la lisi dei WBC. La miscela così ottenuta è trasferita alla testa del laser per la determinazione della formula differenziale che viene visualizzata sullo scattergramma volume/complexità: "4 Diff". Dopo la conta dei WBC in impedenza e la misura dell'Hb, la parte rimanente del campione viene trasferita dalla camera di conta dei bianchi, alla testa del laser. In tal modo l'analizzatore è in grado di separare la popolazione dei basofili dai mononucleati e dai polimorfo nucleati, fornendone il valore percentuale. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le performance dell'analizzatore, confrontando i risultati prodotti, relativi alla formula differenziale con il controllo microscopico effettuato a 200 cellule. A tale scopo sono stati analizzati 212 campioni provenienti dall'urgenza e dalla routine senza alcuna selezione preliminare. Per ciascuno di essi è stato eseguito, su sangue raccolto in EDTA, l'esame emocromocitometrico con ADVIA 560, secondo le specifiche del manuale dell'operatore, e lo striscio di sangue periferico colorato con metodica MGG. Risultati: Relativamente alla popolazione neutrofila: $y=0.96x+2.60$; $R=0.87$; per la popolazione linfocitaria: $y=0.80x+4.70$; $R=0.85$; per quella monocitaria: $y=0.80x+0.50$; $R=0.85$; per gli eosinofili $y=0.70x+0.05$; $R=0.87$; relativamente ai basofili $y=1.00x+0.50$; $R=0.45$. Considerando l'imprecisione e l'inaccuratezza della conta microscopica a 200 cellule, soprattutto per le popolazioni più scarsamente rappresentate, i risultati ottenuti con questo analizzatore sembrano essere in linea con quanto si rileva in letteratura in merito alle performance di altri analizzatori basati su tecnologie differenti.

P058

THE ESTIMATION OF THE URINARY MONOCLONAL PROTEINS: STILL AN OPEN PROBLEM

A. Ciruolo, M. Franzini, A. Paolicchi, L. Caponi

Clinical Pathology Laboratory, AOU Pisana, University of Pisa

The quantification of urinary monoclonal component (UMC), usually as κ or λ light chain, is used to monitor therapeutic response in multiple myeloma patients (Katzmann JA et al, 2011 Clin Chem 57;12:1687). The recommended method is an estimation based on the percentage of UMC identified on the densitometric scan of the electrophoretic separation of total urinary proteins (TUP); however TUP quantification may give different results when different total protein assays are used. To overcome this limitation we tested another approach based on nephelometric determination of urinary albumin (AlbU), which always visible on the immunofixation gel, to obtain another UMC estimations by comparing the two areas of AlbU and UMC.

Twenty urinary samples from multiple myeloma patients showing monoclonal bands on immunofixation were selected, with TUP values, quantified by the automated benzethonium chloride method, ranging from 1.4 to 1800 mg/dl. A densitometric scan of the gel by the software ImageJ was performed and the areas of UMC and AlbU were estimated. Two different calculations of UMC were then performed: one referred to the TUP and the other one to the AlbU. On the same samples urinary light chains κ or λ (ULC) were also directly determined by nephelometry. We found a good correlation between the values calculated by using TUP and AlbU ($r=0.9368$), TUP and ULC ($r=0.9560$), ULC and AlbU ($r=0.9605$), but the ULC determined by nephelometry were always higher than the estimated values, even if the degree of overestimation was highly variable, confirming the discrepancy between methods. It is worth to note that in the samples where elevated values of UMC were estimated with TUP (>50 mg/dl), AlbU based calculation restituted far lower values than ULC determination, likely due to the saturation of the protein staining on the electrophoretic gel.

P059

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI NORMALI DI SYSMEX XN-1000 IN UNA POPOLAZIONE DI DONATORI

F. Esattore, V. Catinella, I. Catallo, G. Di Bernardo, P. Accorsi

U.O.C. di Immunoemat, Med. Trasf., Lab. di Ematologia, Osp. Spirito Santo, Pescara

Scopo: L'evoluzione tecnologica offre strumentazioni sempre più avanzate che consentono di analizzare campioni ematici in maniera più precisa, affidabile e standardizzata. Sysmex XN, di recente introduzione, permette di analizzare nuovi parametri, oltre a quelli tradizionali, come la frazione immatura delle piastrine(IPF)* e la percentuale dei frammenti eritrocitari(FRC), che forniscono informazioni sostanziali sullo stato di salute.

Materiali e metodi: Analizzati 141 donatori (75D, 66U), età 30/50 anni. Determinati M,SD e intervalli di riferimento IR(2,5°-97,5° percentile) per: PLT, IPF(%), IPF #, RET %, RET #, Ret-He, FRC(%) e FRC#. Parametri analizzati in appositi canali di lettura (RET e PLT-F) su XN-1000 (metodo ottico laser in fluorescenza). Statistica: Medcalc, Excel.

Risultati: Per ogni parametro indicati M,SD ed IR.

IPF% D 3.30-1.56-(1.3-7.3); U 3.17-1.60-(0.92-6.29)

IPF# D 8.15-3.9-(3.68-15.79); U 7.35-3.39-(2.6-16.1)

RET % D 1.36-0.34-(0.8-2.1); U 1.31-0.30-(0.78-1.90)

RET # D 0.06-0.02-(0.04-0.1); U 0.07-0.02-(0.04-0.10)

RET-He D 32.8-2.15-(27.7-35.8); U 33.14-1.50-(30.1-36.6)

PLT D 260.24-56.26-(168.13-395.88); U 245.8-56.4-(159.5-375.6)

PLT_O D 252.79-56.26-(163.38-389.38); U 242.2-54.6-(158.5-366)

PLT_F D 260.24-56.26-(168.13-395.88); U 245.83-56.4-(159.5-375.6)

FRC% D 0.03-0.12-(0-0.56); U 0.0008-0.004-(0-0.02)

FRC# D 0.001-0.005-(0-0.024); U 0.00003-0.0002-(0-0.0007)

Distribuzione Normale per tutti.

Discussione e Conclusioni: i risultati ottenuti su una popolazione di donatori, forniscono spunti per lo studio dei pazienti oncoematologici afferenti al nostro centro, utilizzando parametri di recente introduzione, ma non largamente impiegati. Questi parametri come in particolare IPF, che si rivela utile nel monitoraggio della ripresa midollare post terapia o nella valutazione delle trombocitemie*, ed FRC, che identifica la presenza di frammenti eritrocitari, in particolare schistociti, si presentano come parametri ulteriori che forniscono un dato quantitativo automatico di rapido utilizzo clinico. Questi parametri insieme a quelli tradizionali costituiranno un'importante indicazione di diagnosi e monitoraggio nel tempo delle diverse patologie, utilizzando una determinazione automatizzata, rapida e ripetibile.

*Adly et al. Platelets 2014, vol 281,p 6.

P060

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI STRUTTURALI DI SYSMEX XN-1000 IN UNA POPOLAZIONE DI DONATORI

F. Esattore, V. Catinella, I. Catallo, G. Di Bernardo, P. Accorsi

U.O.C. di Immunoemat. Med. Trasf., Lab. Ematologia, Osp. Spirito Santo, Pescara

Scopo del lavoro: L'evoluzione tecnologica offre la disponibilità di nuovi parametri che consentono di approfondire la morfologia cellulare in maniera automatizzata. Sysmex XN, di recente introduzione nel nostro laboratorio, misura i WBC e la formula leucocitaria utilizzando la citometria a flusso in fluorescenza rilevando per Neutrofili (Ne), Linfociti (Ly) e Monociti (Mo), il volume (FSC/Z), la complessità interna (SSC/X) cioè le granulazioni citoplasmatiche e la fluorescenza (SFL/Y), tutti disponibili come media ed eterogeneità di distribuzione (WX, WY e WZ)*.

Materiali e metodi: Analizzati 141 donatori (75D, 66U), età 30/50 anni. Calcolati Intervalli di Riferimento IR (2,5°-97,5° percentile) e Media (M).

Statistica: Medcalc, Excel.

Risultati: Per ogni parametro sono indicati M ed IR.

NE-SSC: D 150.54-(143.13-159.38); U 150.74-(145.23-158.54)

NE-SFL: D 50.14-(46.21-54.9); U 50.70-(46.5-55.1)

NE-FSC: D 94.81-(88.83-100.64); U 94.60-(88.95-100.73)

NE-WX: D 312.37-(286.63-348.13); U 307.33-(284.45-328.70)

NE-WY: D 599.76-(556.38-656); U 612.1-(546.5-679.5)

NE-WZ: D 668.37-(611.88-751); U 676.4-(619.4-742.6)

LY-X: D 79.63-(76.08-81.3); U 80.32-(77.22-82.09)

LY-Y: D 74.63-(69.98-80.25); U 73.70-(69.13-78.16)

LY-Z: D 64.17-(62.43-65.76); U 63.48-(61.49-65.30)

LY-WX: D 519.93-(446.75-637.75); U 489.18-(427.15-575.85)

LY-WY: D 889.29-(759.75-1024.25); U 881.21-(743.75-1023.90)

LY-WZ: D 571.9-(509.88-631.88); U 578.91-(536-628.85)

MO-X: D 120.12-(117.15-124.46); U 119.03-(116.90-120.99)

MO-Y: D 118.22-(107.43-129.55); U 115.26-(102.44-125.73)

MO-Z: D 71.60-(68.31-74.83); U 70.82-(67.72-73.59)

MO-WX: D 266.23-(216.38-314.63); U 266.76-(224.60-300.80)

MO-WY: D 700-(548-874.88); U 706.50-(533.40-852.20)

MO-WZ: D 644.09-(544-748.88); U 642.80-(528-766.15)

Distribuzione Normale per tutti.

Discussione e Conclusioni: Definire gli ambiti di normalità sui donatori risulta fondamentale per la valutazione dei casi patologici. Studi successivi potranno determinarne l'andamento per specifiche patologie ematologiche allo scopo di standardizzare la valutazione morfologica automatizzata. Potranno essere definiti cut-off che, insieme alle segnalazioni strumentali, indirizzino nel percorso diagnostico del campione patologico.

*Brisou et al. J Clin Lab Anal 2014. doi 10.1002/jcla.21744.

P061

**IL PERCORSO ANALITICO DI LABORATORIO
NELLA DIAGNOSTICA DELLA MALATTIA CELIACA:
INTRODUZIONE DEL TEST RIFLESSO**

F. de Liso, C. Matinato, M. Ronchi, M. Arghittu, E. Torresani

*Lab. di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia,
Fondazione IRCCS Ca' Granda Osp. Maggiore
Policlinico, Milano*

A partire dal 1° Novembre 2014, ai sensi del DGR n° X/2313 del 01/08/2014, la regione Lombardia ha introdotto, per la diagnostica di laboratorio della Malattia Celiaca (MC) in caso di "prima diagnosi", la prestazione "Anticorpi Anti Transglutaminasi Riflessa". Tale prestazione prevede, in prima analisi, il dosaggio delle Immunoglobuline di classe A (IgA Totali) che se nella norma generano automaticamente l'esame Anti Transglutaminasi IgA (tTG IgA); in caso di positività di tTG IgA si eseguirà, come test di conferma, la ricerca degli anticorpi Anti Endomisio (EMA) con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta. La ricerca degli anticorpi Anti Gliadina Deamidata (AGA GDP IgA e IgG) è prevista per i bambini con età inferiore ai due anni anche in caso di tTG IgA negativo e quella degli anticorpi Anti Transglutaminasi IgG (tTG IgG) in associazione agli AGA GDP IgG in caso di deficit di IgA. L'introduzione di questo algoritmo analitico, nel caso di sospetto di malattia Celiaca, ha l'obiettivo di rendere più appropriato il percorso diagnostico evitando indagini superflue. Abbiamo pertanto voluto valutare l'impatto di questo nuovo approccio sia dal punto di vista dei dati quantitativi (n° di esami totali) che qualitativi rispetto alle richieste precedenti l'introduzione del reflex (2014) e parallele ad esso (primi 5 mesi del 2015). Nel 2014 (gennaio-ottobre) sono stati eseguiti globalmente 8708 esami (circa 870 esami/mese) la cui positività media era del 7%. Con l'introduzione del reflex, il numero di esami richiesti per sospetto di Celiachia era 368/mese mentre quelli richiesti con la vecchia modalità di prescrizione erano 230/mese con positività media analoga a quella dell'anno 2014 (9%). Il nuovo approccio diagnostico ha portato ad un incremento della positività media (19%) dovuto principalmente al maggior numero di EMA positivi/EMA eseguiti. Complessivamente, il numero degli esami si è ridotto del 33% rispetto al 2014. Da questa prima valutazione risulta evidente come l'introduzione di un percorso diagnostico più razionale abbia ridotto il numero totale dei test eseguiti e migliorato la sensibilità diagnostica grazie ad una maggiore appropriatezza nella richiesta degli esami.

Fasano A, Catassi C. Celiac Disease. NEJM 2012;367:2419-26.

P062

**INCREASED LEVELS OF POLYCLONAL
IMMUNOGLOBULIN FREE LIGHT CHAINS IN
PATIENTS AFFECTED BY MYASTHENIA GRAVIS
AND AUTOIMMUNE HYPERTHYROIDISM**

M. Renis, M. Greco, P. Cofano, F. Sicuro, G. Lobreglio

U.O. Patologia Clinica, P. O. "Vito Fazzi", ASL Lecce

Background and aim: Myasthenia gravis (MG) and autoimmune hyperthyroidism (Graves Disease, GD) are auto-immune disorders characterized, in the majority of cases, by the presence of auto-antibodies against Acetylcholine Receptor (AChR-Ab) and TSH Receptors (TSHR-Ab), respectively.

Previous studies have found increased systemic free light chains (FLC) concentration in patients with various chronic inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis and upper and lower airway diseases. In this study we evaluated serum FLC in MG and GD patients, to investigate their clinical significance in these autoimmune diseases.

Materials and Methods: The present study included 41 MG patients (19 men, 22 women), 21 GD patients (7 men, 14 women) and 30 normal controls. All patients had elevated auto-antibodies level (AChR-Ab or TSHR-Ab) and no kidney diseases, hypergammaglobulinemia or monoclonal gammopathy. Serum kappa and lambda FLC isotype levels and their combined level were measured using an immunoturbidimetric assay on the Roche Modular P analyzer (Freelite kit, The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK).

Results: Elevated FLC concentration was found in 18 MG patients (43,9%), in particular 13 had elevated kappa and 5 elevated lambda (2 patients showed very high KFLC, 293 and 102,9 mg/L, with an abnormal increased kappa/lambda ratio); only one of the controls had increased k FLC concentration ($p < 0,01$). Combined FLC level was higher in patients with MG (average 41,3 mg/L) than in healthy controls (average 21,57 mg/L). Patients affected by autoimmune hyperthyroidism didn't show the same result, as increased FLC level was found only 4 GD patients (19%).

Conclusions: This study showed a significant increase in FLC kappa or lambda in almost half of patients affected by MG but not in GD patients. The increased concentration of kappa or lambda component in MG patients may reflect a greater polyclonal B lymphocyte activation, similarly to other autoimmune diseases, thus appearing as a good potential biomarker for its evaluation. Preliminary studies showed a correlation between polyclonal FLC concentrations and disease activity in patients with autoimmune diseases; in addition, FLC exert a variety of biological activities (IL-8 production, mast cell degranulation, prevention of neutrophil apoptosis) with a potential role in the pathogenesis of inflammatory diseases.

P063

ANTI-TNF α BIOLOGICS IN RHEUMATIC DISEASES: DRUG AND ANTI-DRUG ANTIBODY LEVELS AND CLINICAL EFFICACY

S. Lombardi¹, S. Ravenna¹, G. Occhipinti⁵, D. Bertolucci², R. Cecchetti³, F. De Giorgio⁴, A. Palagi¹, G. Bertacca¹, I. Giannelli¹, E. Bonomi¹, M. Friggeri¹, D. Ricci¹, C. Bernardoni⁶, G. Tartarelli⁶

¹SSD Analisi ChimicoCliniche ed ImmunoAllergologia, USL1 Massa Carrara

²Centro di Reumatologia, USL12 Versilia

³Centro di Reumatologia, USL5 Pontedera

⁴Centro di Reumatologia, USL3 Pistoia

⁵Centro di Reumatologia, USL6 Livorno

⁶U.O. Reumatologia, USL1 Massa Carrara

Objective: The aim of this study was to evaluate the relevance of drug and anti-drug antibody levels on the clinical efficacy of anti-TNF α biologics in patients with rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), spondyloarthropaties (SpA) and psoriatic arthritis (PA) (Meroni P.L. et al. 2015).

Methods: The study included adults consecutive patients treated for at least 6 months with adalimumab (ADA) or etanercept (ETN) or infliximab (IFX); patients underwent clinical observations to the Rheumatologic Unit of 5 Hospitals in Tuscany.

Their demographic and clinical characteristics, skin and joint disease activity (to calculate DAS28 and BASDAI scores) were collected. Drug levels (ELISA) and anti-drug antibodies (ADAb, Bridging ELISA) were evaluated immediately before drug injection or infusion.

Results: A total of 192 patients were studied: 62 receiving IFX, 64 ADA, and 66 ETN with a mean age of 57 years (range 18-86 yrs); the study group was composed of 51% women. Fourthly percent of the patients were affected by AR, 25% by AS, 15% by SpA and 20% by PA. Altogether, 81% of patients demonstrated therapeutic drug levels. ADAb were found in 19% of patients taking IFX, 9% taking ETN and 5% taking ADA. No significant correlation was found between ADAb presence and low drug levels, between ADAb and high DAS28 and BASDAI scores, as well as between low drug levels and high DAS28 and BASDAI scores.

Conclusions: Low drug levels were found in 19% of the rheumatic patients and there were not correlations with presence of ADAb or patient's clinical status.

Meroni PL, Valentini G, Ayala F, et al. New strategies to address the pharmacodynamics and pharmacokinetics of tumor necrosis factor (TNF) inhibitors: A systematic analysis. *Autoimmun Rev* 2015;15:109-203.

P064

EVALUATION OF BONE METABOLISM DURING ANTI-TNF THERAPY IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

C. Petruzzellis¹, L. Sparano¹, P. Cesari¹, C. Boselli², F. Pagani²

¹Department of Medicina, Gastroenterology and Endoscopy, Fondazione Poliambulanza Hospital, Brescia

²Department of Laboratory Medicine, Fondazione Poliambulanza Hospital, Brescia

Inflammatory bowel diseases (IBD) are associated with increased risk of developing osteopenia or osteoporosis. This is due to many factors some of which related to disease activity, such as increased concentration of pro-inflammatory cytokines, and some related to the specific therapies. In particular, in addition to its role in the pathogenesis of intestinal inflammation, the TNF- α has direct, detrimental effects on osteoblast activity. Osteoblast are responsible for bone formation, whereas osteoclast are responsible for bone resorption, the two phases are coupled in bone remodeling. Aim of the study was to examine short-term changes in biomarkers of bone formation, serum procollagen type I N propeptide (PINP), and bone resorption, serum collagen type I C-telopeptide (CTX), as recommended by IOF/IFCC, following initiation of anti-TNF- α therapy (Infliximab, IFX) and the association with disease activity over 54 weeks of IFX therapy. Serum samples for bone markers were collected at baseline (T0), before starting the therapy, and every two months. At T0 patients underwent (1) clinical evaluation, (2) endoscopic evaluation, (3) inflammatory laboratory test (reactive protein C (RPC) and fecal calprotectin, and (4) measurement of bone mineral density using dual energy x-ray absorptiometry (DEXA). Every two months patients underwent through the steps 1) and 3). All the patients (pts) showed no sign of osteopenia or osteoporosis at DEXA. A preliminary analysis of the first 5 enrolled pts, after two months of IFX therapy, showed: 2 pts with baseline levels of CTX within reference interval (RI) and elevated levels of PINP had an increase of CTX and a decrease of PINP; 3 pts with baseline levels of both CTX and PINP within RI had unmodified CTX levels but increase of PINP. Almost all pts showed biochemical inflammation and endoscopic-clinical moderate activity at T0 and a clinical response and normalization of RPC at T2.

Our findings indicate a modulation effect of IFX therapy on osteoblast in all pts, but a heterogeneous effect on osteoclast activity. These results represent preliminary but promising data that could expand knowledge of the interactions between cytokines and bone in the bone-remodeling process.

P065

NEFRITE LUPICA: CISTATINA C E β 2-MICROGLOBULINA SIERICA, α 1-MICROGLOBULINA URINARIA E RAPPORTO ALBUMINA/CREATININA URINARIA COME POSSIBILI BIOMARCATORI DI ATTIVITA' DI MALATTIA

C. Di Mario¹, F. Forni², L. Messuti¹, L. Petricca¹, A. Barini², M.R. Gigante¹, G. Marino¹, E.S. Ferraccioli¹, E. Gremese¹

¹Istituto di Reumatologia e Scienze Affini, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Istituto di Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Introduzione: La nefrite lupica è una delle manifestazioni più severe del Lupus Eritematoso Sistemico (LES), ne influenza la prognosi e le decisioni terapeutiche. È quindi necessario intervenire precocemente all'esordio e sulle riacutizzazioni di malattia. Lo scopo dello studio è stato individuare nuovi biomarcatori per il monitoraggio della nefrite più sensibili rispetto a quelli convenzionali (C3, antiDNA, proteinuria delle 24 ore e creatinina).

Materiali e metodi: Sono stati arruolati 73 pazienti consecutivi con diagnosi di LES a coinvolgimento renale, sia attivo che inattivo. Di questi pazienti sono state effettuate valutazioni cliniche e laboratoristiche al basale, dopo 3 e 6 mesi. Ad ogni visita sono stati dosati mediante test immuno-turbidimetrico (Roche Diagnostics) automatizzato su Cobas c501 i livelli sierici di Cistatina C e i livelli urinari dell' α 1microglobulina e calcolato il rapporto albumina/creatinina urinaria (ACR) e i livelli sierici di β 2microglobulina mediante metodo nefelometrico automatizzato su nefelometro BN II (Siemens).

Risultati: Dei 73 pazienti con nefrite lupica arruolati (femmine 83%, età 38,5 \pm 12,0 anni, durata di malattia 13,0 \pm 8,8 anni), al basale 24 (32.8%) avevano una nefrite attiva. I pazienti con nefrite attiva avevano livelli più alti di SLEDAI (p <0,01), della proteinuria delle 24 ore (p <0,01), così come di cistatina C sierica (p=0,01), α 1microglobulina urinaria (p=0,005) ed ACR (p <0,01). Durante i 6 mesi del monitoraggio dei 49 pazienti con nefrite inattiva al basale, 11 (22.4%) pazienti hanno presentato una riacutizzazione renale. Questi pazienti al basale avevano valori più alti di cistatina C sierica (1,9 \pm 0,6 vs 0,9 \pm 0,2 mg/L, p=0,001), β 2microglobulina sierica (4,0 \pm 2,6 vs 2,0 \pm 0,8 mg/dl, p=0,001), α 1microglobulina urinaria (p <0,01) e ACR (279,9 \pm 440,1 vs 6,9 \pm 12,0 mg/g, p <0,01) rispetto ai pazienti con nefrite stabilmente inattiva. Non vi erano differenze nei parametri classicamente usati nel monitoraggio della nefrite.

Conclusioni: I risultati del nostro studio, benché preliminari, suggeriscono che questi nuovi biomarcatori, di rapida e facile esecuzione, integrati con i biomarcatori convenzionali, possono dare informazioni aggiuntive sullo stato della nefrite e possono inoltre predire più precocemente una sua riacutizzazione.

P066

CREATININE VERSUS CYSTATINE BASED GLOMERULAR FILTRATION RATE IN PATIENTS TREATED WITH ORAL DIRECT THROMBIN INHIBITORS

S. Valverde¹, F. Antico¹, M.M. Salvadego¹, F. Gessoni¹, L. Valle², R. Valle², G. Gessoni¹

¹Clinical Pathology Dept., Chioggia Hospital

²Cardiology and Intensive Coronary Unit, Chioggia Hospital

Background: Dabigatran (DAB), an oral direct FIIa inhibitor, is 80% renally excreted. Glomerular Filtration Rate (GFR) estimation is recommended to adjust DAB dosage. In this paper we report some preliminary results about evaluation of Creatinine (CRE) GFR and Cystatin (CYS) GFR in a group of patients treated with DAB.

Materials and Methods: We considered 77 patients treated with DAB 110 mg bis in die. In these patients we performed an evaluation of kidney function using CRE and CYS based GFR prediction equations following the KDIGO model. CRE was measured using a IDMS traceable dry chemistry enzymatic method and OCD Vitros 5.1 analyzers. CYS was measured using an immunochemistry IFCC traceable assays and Tosoh AIA 2000 analyzers. After GFR calculation these patients were classified as recommended by KDIGO guidelines. In patients with discordant classification a creatinine clearance was performed. In all these subjects we evaluated DAB plasma concentration in the morning before drug assumption.

Results: Mean CRE GFR was 58 \pm 17 mL/min, mean CYS GFR was 51 \pm 21 mL/min this difference was statistically significant (p=0.03). Bland-Altman elaboration confirmed that CYS GFR was lower than CRE GFR. Following KDIGO criteria, patients classification performed by using CRE GFR or CYS GFR was concordant in 44 subjects and discordant in 23 (29%). In 21/23 discordantly classified patients the creatinine clearance confirmed classification performed by using CYS GFR. We observed an inverse relationship between DAB concentration and GFR, this relationship seem to be more stringent with CYS GFR (R=-0.59) than with CRE GFR (R=-0.51).

Conclusions: In this group we observed that CYS GFR was lower than CRE GFR. These differences in the estimation of GFR resulted in a different classification in 23 (29%) of considered patients. Creatinine clearance confirmed classification performed according to CYS GFR in 21/23 (91%). Results obtained in this study, although preliminary and in need of confirmation, would seem to suggest that, in this particular subset of patients, the determination of CYS GFR can be a better renal function indicator than CRE GFR. Moreover we observed a better correlation between nadir DAB concentration and CYS GFR than with CRE GFR.

P067

STUDIO DEL FATTORE DI VON WILLEBRAND NEI PAZIENTI CON STENOSI VALVOLARE AORTICA: SINDROME DI VON WILLEBRAND ACQUISITA?F.G.R. Viola¹, R. Massaud¹, M. Iozzo¹, A. Valentini¹, C. Buonomo², D. Colella², S. Bernardini¹¹Lab. di Biochimica Clinica, Policlinico Tor Vergata, Roma²Unità di Cardiocirurgia, Policlinico Tor Vergata, Roma

La Sindrome di Von Willebrand acquisita (AvWD) è una coagulopatia rara che può portare a sanguinamenti chirurgici inaspettati. Nei pazienti con stenosi valvolare aortica lo "shear stress" imputato alla valvola, promuoverebbe il clivaggio del vWF da parte di ADAMTS13, con perdita di HMWM. Lo scopo è di valutare i livelli circolanti del vWF e del fattore VIII prelevando 2 campioni uno in citrato e l'altro in hirudina ai tempi T0 (prima dell'anestesia), T1 (post operatorio) e T2 (ventiquattro ore dopo) per la determinazione quantitativa del VWF:Ag e del VWF:Rco. analisi statistica. La concentrazione ottenuta del vWF:Ag è sempre compresa o superiore al range (52.2-177.9%) con valori della mediana di 149,3%; 179,8% e 243,1% rispettivamente per T0, T1 e T2. Il test Friedman evidenzia una $p=0.005$. Il test di Wilcoxon mostra una $p=0.001$ tra i valori ottenuti al tempo T0 e T1 ed una $p=0.008$ tra T0 e T2. La concentrazione del vWF: Rco è compresa o superiore al range (45.6-176.3%) con valori della mediana di 130.7%; 198.4% e 261.5% rispettivamente per T0, T1 e T2. IL test di Friedman evidenzia una $p=0.001$. Il test di Wilcoxon mostra una $p=0.000$ tra i valori ottenuti al tempo T0 e T1 ed una $p=0.005$ tra T0 e T2. Il rapporto vWF:Rco/vWF:Ag risulta sempre normale. La risposta aggregometrica e i valori del fattore VIII non evidenziano anomalie. Dei 25 pazienti da noi studiati nessuno è risultato avere la sindrome di von Willebrand. All'analisi dell'antigene abbiamo riscontrato un trend in aumento tra il T0 e il T1 (test di Wilcoxon) a conferma che dopo la sostituzione della valvola stenotica vi sia un miglioramento e quindi un aumento delle concentrazioni di vWF. L'assenza dei HMMW non può essere, da sola la causa di un sanguinamento nei pazienti con stenosi aortica, però, in circostanze, come un intervento chirurgico complesso, il sanguinamento massivo nel postoperatorio, in un paziente con una valvola aortica stenotica non sostituita, può essere attribuito alla perdita degli HMWM.

1. Solomon C, Budde U, Schneppenheim S, et al. Acquired type 2A von Willebrand syndrome caused by aortic valve disease corrects during valve surgery. *Br J Anaesth* 2011;106:494-500.2.

P068

NEW D-DIMER CUT-OFF VALUE TO IMPROVE THE EXCLUSION OF PULMONARY EMBOLISM IN ELDERLY PATIENTS: THE I.N.R.C.A. EXPERIENCER. Galeazzi¹, F. Marchegiani¹, A. Marziali¹, A. Cherubini², V. Petrella², S. Ricci³, S. Piomboni³, A. Evangelisti³, S. Giovagnetti¹, F. Busco¹¹Clinical Laboratory and Molecular Diagnostic, Italian National Research Centers on Aging (INRCA), Ancona, Italy²Geriatric Unit and Geriatric Emergency Room, Italian National Research Centers on Aging (INRCA), Ancona, Italy³Department of Radiology, Italian National Research Centers on Aging (INRCA), Ancona, Italy

Introduction: The use of D-Dimer (DD) in the diagnostic algorithm for a "suspected" pulmonary embolism (PE) is common in clinical practice and a cut-off of 500 µg/L, to define patients potentially at risk for this disease, is traditionally accepted. Especially in the oldest, this cut-off seems not to be "suitable" being the DD concentration physiologically higher in this group of people. This concern has resulted in a revision by several researcher in the world of the cut-off in order to find a value better adapted to the elderly population. In the literature, several authors have proposed new age adjusted DD cut-off level (e.g. cut-off=age x 10) to overcome this problem. Also our Institute, whose main goal is the study of aging, has recently started a project in collaboration with the Geriatric Emergency Care Department (GECED) aimed at redefining the use of DD in the management of PE.

Materials and Methods: The sample was composed of 2776 patients (gender, mean age±SD; 1646 females, 84,2±9,3 years and 1130 males, 82,0±10,4 years) consecutively admitted to the GECED between January 2013 and April 2015 and for which results of DD were available. The DD assay was performed on cs-2100i Sysmex Siemens using a conventional cut-off level of 500 µg/L. Statistical analyses were performed using STATA.

Results and Conclusions: In our sample, the mean level of DD was 3336±7777 µg/L (mean±SD) and the percentage of patients with DD concentrations below the conventional cut-off (500 µg/L) was only 22,5% (626 patients). The mean of DD in our sample is six times higher than that of reference and the same result is obtained when gender is considered. As expected, a significant age related increase of DD was found ($p<0,05$), also when gender was considered. Of these patients, 261 that were suspicious for PE underwent to TC and/or scintigraphy; only 56 (2%) were really suffering of PE. We also observed a strong correlation between high levels of DD and altered inflammatory (White Blood Cell and C-reactive Protein) and renal (creatinine and eGFR) parameters ($p<0.05$). Finally, with this study, we would support the need of the introduction of a new DD cut-off value (1050 µg/L) in the management of PE, tailored for a geriatric population. Lippi G, Cervellini G, Casagrande I, et al. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:621-8.

P069

PREVALENCE OF ACTIVATED PROTEIN C RESISTANCE/ FACTOR V LEIDEN IN POTENZA

d. Dragonetti¹, M.A. Rizzo¹, M. Pizzuti¹

¹Unità Operativa di Laboratorio Analisi, Az. Osp. San Carlo, Potenza

²Unità Operativa di Laboratorio Analisi, Az. Osp. San Carlo, Potenza

³Unità semplice di Emostasi e Trombosi, U.O. Ematologia, Az. Osp. San Carlo, Potenza

Background: Activated Protein C Resistance (APCR), a poor anticoagulant response of APC in haemostasis due in most cases to the polymorphism of FV Leiden, is associated with thrombophilia. This polymorphism as a 5% prevalence in general population, that increases to 25-30% in the individuals with precedent thromboembolic event or their relatives.

Aim of the study: We investigated the incidence of APCR in our population as an indicator of congenital thrombophilic alterations. We examined a total of 300 women (mean age 46±16 years), coming from Potenza, for whom the physician had asked the determination of APCR.

Methods: From March 2012 to April 2014, 300 patients underwent to APCR test. We executed a second generation diagnostic assay, based on APTT, with pre-dilution of the patient's plasma with a Factor V deficient plasma to increase the specificity for the mutation R506Q FVLeiden. Cut off: Ratio ≥2.00

Results: 32 (10,6%) of 300 examined women had APCR ratio <2.00 (mean ratio 1,81±0,10). The remaining 268 had APCR ratio >2.00 (mean ratio 2.63±0.33). We executed confirmatory molecular analysis on the 32 patients with ratio <2.00 and they were identified as heterozygotes.

Conclusions: The prevalence of APCR in our population is 10,6%. So, despite our population has a selection bias, the percentage of patients affected is less than the population selected for thrombophilia. Potenza's population, because of its territory's orographic composition and the resulting poor immigration experienced over the centuries, has been subjected to an allopatric speciation. So, our results became more significant. Moreover, the RPCA assay is an excellent screening test that shows a high correspondence with the confirmation obtained through DNA studies.

P070

DABIGATRAN IN ROUTINE COAGULATION TESTS: A RESPONSIVENESS EVALUATION

A.R. Corno¹, R. Redaelli¹, L. Borroni¹, M.G. Somaini¹, T.M. Caimi², G. Gesu¹

¹S.C. Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, A.O. Osp. Niguarda Ca' Granda, Milano

²S.C. Ematologia, S.S. Emostasi, A.O. Osp. Niguarda Ca' Granda, Milano

Background: Dabigatran, an oral direct thrombin inhibitor, would not require laboratory monitoring; however, in certain clinical situations, the evaluation of its anticoagulant effect by routine coagulation tests could be helpful.

Objective. We evaluated the responsiveness to Dabigatran of Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), Prothrombin Time (PT) and Thrombin Time (TT). Materials and methods: Dabigatran levels were measured in plasma samples from ambulatory patients receiving Dabigatran and in lyophilized controls/calibrators by means of the Diluted Thrombin Time (Hemoclot, Hyphen BioMed, France) on ACL TOP (Instrumentation Laboratory-IL, USA). The same samples were tested in APTT, PT and TT using the following reagents and instruments, respectively: APTT-SP, APTT-SS on ACL TOP, and APTT Pathromtin on BCS (Siemens, Germany); Recombiplastin 2G on ACL TOP and Thromborel S on BCS; Thrombin Time on ACL TOP. Responsiveness, calculated from regression equations, was defined as the Dabigatran concentration needed to double the measured parameter [1].

Results: Statistical significant correlations (P <0.0001) were observed between Dabigatran levels (0-520 ng/mL) and all APTTs with Spearman's rho values of 0.876 for APTT-SP, 0.892 for APTT-SS (ACL TOP) and 0.919 for Pathromtin (BCS). Statistical significant correlations (P <0.0001) were obtained between Dabigatran levels (29-520 ng/mL) and PT, with rho values of 0.819 for Recombiplastin 2G (ACL TOP) and 0.851 for Thromborel S (BCS). TT was too responsive to the Dabigatran presence (Ratios >5 for drug levels around 29 ng/mL). APTT responsiveness to Dabigatran was 140 ng/mL for APTT-SP, 212 ng/mL for APTT-SS (ACL TOP), and 72 ng/mL for Pathromtin (BCS). PT responsiveness was 447 ng/mL for Recombiplastin 2G (ACL TOP) and 234 ng/mL for Thromborel S (BCS).

Conclusions. Responsiveness to Dabigatran of routine coagulation tests depends on the system (test/reagent/instrument). In our study, APTT responsiveness was higher than PT and varied according to the kind of reagent/instrument. Laboratories should establish the responsiveness of the system in use and share this information with clinicians for the management of patients in special circumstances.

1. Tripodi A. The laboratory and the New Oral Anticoagulants. Clin Chem 2013;59:353-62.

P071

IS COCROFT-GAULT EQUATION THE BETTER EGFR METHOD TO DIRECT DOSAGE ADJUSTMENT FOR NOACS IN THE ELDERLY?

L. Ruocco¹, M.P. Salvadorini¹, T. Pavia¹, A.M. Romanelli², G. Pellegrini¹

¹*U.O. Laboratorio Analisi Cliniche, Ambulatorio Antitrombosi AOU Pisana, Pisa*

²*Fondazione Monasterio, C.N.R. Pisa*

Aim: The variability of renal function is mandatory to determine the drug dosage for new direct anticoagulant drugs (NOACs): this is less important for Rivaroxaban and Apixaban management than for Dabigatran, because of their pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics. Renal function (estimated glomerular filtration rate: eGFR) were evaluated in the phase III-studies of NOACs by Cockcroft-Gault (CG) equation and the patients were assessed by 4 classes for defining enrolling and drug-reduction of doses, related to bleeding risk. So a correct definition of renal function in these patients is mandatory. The recent guidelines about eGFR underline the use of CKD-EPI equation instead CG and MDRD. Moreover the BIS1 formula seems to be useful for older patients (>70yold). So the aim of the study is to compare different equations used to estimate eGFR in a population of patients in AVK therapy eligible to NOACs. **Methods:** In 129 over 70yold afferent patients (79,24 ±4,97y) to the Antitrombosis Centre of AOU Pisana eligible to NOACs, was tested eGFR by CG, MDRD, CKD-EPI and BIS1 equations. The 4 classes of clearance (>50 ml/min, 30-50, 15-30 and <15) used in previous recruitment studies were compared with the 6 classes (>=90 ml/min, 60-89, 45-60, 30-44, 15-29 and <15) in according to the recent guidelines.

Results: The eGFR of patients studied were matched for sex without significant differences (71M: 79,04±4,75yold; 58F: 79,48±5,26 yold; Z-.62 p=.54). Patients within class 3 (45-60ml/min) by CG or BIS1 equations showed significant differences in mean values comparing CG (52,68±10,19) vs BIS1 (49,13±6,87): n. 68 t(67)=3,01 p=.004. The same significant trend was found in patients within class 2 (60-89 ml/min) by CG or BIS1 equations (mean CG 73.39±14,55; BIS 1 64,26±7,94): n. 57 t(56)=5,34, p <.001.

Conclusion: The preliminary findings of this study confirm the usefulness of BIS1 equation to identify early kidney damage in "frail" patients over 70yold. The main results suggest the importance to carefully assess "frail" patients over 70yold, enrollable to NOACs, with eGFR evaluation. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Supp* 2013;3:1-150.

P072

APTT SCREENING TEST IN PATIENTS UNDERGOING SURGICAL PROCEDURES

L. Zardo¹, P. Radossi², S. Chiappin¹, R. Salviato², L. De Valentin¹, S. Luzi¹, R. Turrini¹, M. Pradella¹, G. Tagariello²

¹*Laboratory, Castelfranco Veneto Hospital, Castelfranco Veneto, Italy*

²*Transfusion and Haematology, Castelfranco Veneto Hospital, Castelfranco Veneto, Italy*

In Italy coagulation screening prior surgical procedures is routinely performed with the scope to guide the operative care.

Evidence from literature suggests that elongated aPTT, considered independently, is not adequate to predict patients' bleeding risk.

We have evaluated aPTT in the cohort of patients undergoing elective surgery from 1st January to 31st December 2014 a total of 8071 patients (pts) were screened.

In 7606 pts (94,2%) aPTT ratio was within the normal range while 465 (5.8%) was abnormal. 223 pts were between 1.2 and 1.3 ratio and we considered these setting not suitable of further investigations. In 242 patients aPTT ratio was higher than 1.3 and in this subgroup the vast majority (201 patients, 83%) were on oral anticoagulation therapy (OAT) explaining the abnormality because of the involvement of the vitamin K dependent factor IX. 3 pts were not confirmed when repeated and 2 pts were already known as mild haemophilia with FVIII 9% and 18% respectively. 4 patients were affected by chronic liver diseases. 11 cases were tested for intrinsic pathway: 7 cases were identified as lupus anti-coagulant, 3 pts had mild FXII deficiency (53%, 51% and 38% vs normal value > 70%), a pts had mild FXI deficiency (50% vs normal value > 70%). 21 patients underwent to operations without any other clarifications of the defect but surgery was performed safely. **Conclusion:** in the preoperative setting our results seem to confirm the low prevalence of coagulation defects in the general population. Screening clotting tests and aPTT ratio elongation seem in relationship mainly with OAT while the rest is represented by mild coagulation defects without any predictive meaning about the bleeding risk. On the contrary accurate anamnestic personal history, including medications (mainly OAT) seems more useful to predict the risk of bleeding and coagulation tests abnormality. According to our results we think that preoperative lab tests should not be performed routinely to guide the perioperative care.

P073

UN RARO CASO DI EMOFILIA A ACQUISITA NEL POST-PARTUM

M. Martelloni¹, L. Galli¹, G. Campeol¹, M. Franzini¹, L. Caponi¹, N. Cecconi², A. Paolicchi¹

¹S.D. Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

²U.O. Ematologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

L'emofilia A acquisita è un raro disordine caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi diretti contro il fattore VIII circolante. Condizioni sottostanti possono essere evidenziate in circa il 50% dei pazienti (malattie autoimmuni, neoplasie solide, malattie linfoproliferative, gravidanza). Nel periodo post-partum, l'emofilia acquisita si manifesta generalmente tra il primo e il quarto mese dopo il parto (Huth-Kühne et al., Haematol. 2009;94:566-575).

Descriviamo il raro caso di una donna di 34 anni giunta all'osservazione dell'U.O. di Ematologia dell'AOU Pisana circa tre mesi dopo il parto per comparsa di ematomi spontanei agli arti e ginocchio edematoso in assenza di emartri.

Gli esami di laboratorio hanno evidenziato anemia (Hb 10.8 g/dL, Val.Rif.=11.5-15.5 g/dL), con piastrine nella norma (218.000/ μ L), normale tempo di protrombina (PT ratio=1.0), prolungamento del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT ratio=3.36, VR=0.85-1.2) con ridotta attività del fattore VIII (0.6 %, VR=50-150%). Nonostante una marcata correzione dell'aPTT dopo mixing con pool di plasmi normali (aPTT ratio=1.09), la ricerca dell'anticorpo specifico contro il fattore VIII, secondo metodo Bethesda modificato, ha restituito un valore di 8,16 UB/mL (VR=assente).

La paziente ha pertanto iniziato terapia steroidea mostrando, nei successivi controlli, costante riduzione dei livelli dell'inibitore fino al valore di 0,88 UB/mL per poi risalire dopo circa due mesi al titolo di 3,8 UB/mL. Vista la scarsa efficacia del trattamento immunosoppressivo di prima linea, la paziente ha iniziato terapia con Rituximab (anticorpo monoclonale anti-CD20) e sospeso gradualmente la terapia steroidea.

Dopo tre settimane di trattamento con Rituximab la paziente ha mostrato normalizzazione dell'aPTT e dei livelli di attività del fattore VIII (102%) con scomparsa dell'anticorpo inibente il fattore VIII. Nei controlli successivi fino ad oggi la paziente ha sempre mostrato normale profilo emocoagulativo.

Nonostante la letteratura riporti una scarsa correlazione tra l'entità delle manifestazioni cliniche ed il livello dell'inibitore, questo caso conferma che la valutazione dei livelli dell'inibitore può essere di aiuto nel valutare l'efficacia della terapia immunosoppressiva in questa tipologia di pazienti.

P074

FIBRINOGEN DETERMINATION IN PREGNANCY: FLEV VERSUS STANDARD VON CLAUSS METHOD

D.E. Fontana¹, N. Tanzi¹, A. Poz¹, R. Giacomello¹, M. Cafagna², C. Matellon², A. Spasiano²

¹Department of Laboratory Medicine, University Hospital Udine, Udine, Italy

²Department of Anesthesia and ICM, University Hospital Udine, Udine, Italy

Background: Early identification and intervention required by obstetric hemorrhage prompts clinicians to opt for thromboelastography (TEG) over more time-consuming traditional laboratory testing; hence its emergence as the standard of care. TEG derived functional fibrinogen level (FLEV) assesses the active fibrinogen which is crucial for haemostatic control. It seemed pertinent to compare this method to the current standard fibrinogen assay, the Clauss method (QFA).

Methods: Patients were divided into 3 groups: healthy volunteers (A), hemorrhagic pregnant patients (B) and healthy term pregnancy patients (C). FLEV assays were performed on the TEG® Hemostasis Analyzer (TEG-5000 Haemoscope, USA) while Clauss fibrinogen levels (QFA) were measured on the ACL TOP system (IL, Milan). The groups were compared using non parametric statistical analysis and the bias was assessed according to Bland-Altman.

Results: No statistically significant differences exist between the 2 pregnant groups ($p < 0.05$) for QFA and FLEV, therefore a single group (B+C) was made uniting the two. Comparison between the healthy controls (A) and the new pregnant group (B+C) demonstrated statistically significant differences ($p < 0.0001$).

Reference intervals differed between the four groups. For group A, QFA (189-367 mg/dL) correlates with our laboratory's reference range, while FLEV (276-567 mg/dL) exceeds the reference interval suggested by the manufacturer. For group B+C, QFA was 230-653 mg/dL and FLEV 307-790 mg/dL.

Correlation between QFA and FLEV in groups A ($r=0.470$), C ($r=0.356$) and B+C ($r=0.494$) was always low, with a good result for group B ($r=0.929$). Bland-Altman analysis of QFA and FLEV demonstrated a strong negative bias in both group A and group B+C.

Conclusions:

1. Statistically significant differences between the control group and the pregnant group necessitate the determination of appropriate reference ranges.
2. The moderate correlation of QFA and FLEV in either population is confirmed by Bland-Altman, which demonstrates no significant agreement between the two methods; probably related to the effect of other plasma components on the thromboelastograph.
3. The divergent behaviour of the hemorrhagic pregnant patients might be related to small sample size, indicating the need for further studies.

P075

DNA DOUBLE-STRAND BREAKS ARE INCREASED IN ATHLETES COMPLETING A 10-KM AND A 21-KM RUNS

G. Lippi¹, R. Buonocore¹, C. Tarperi³, M. Montagnana², M. Benati², G.L. Salvagno², G. Lima-Oliveira², R. Perini¹, C. Bonaguri¹, G.C. Guidi², F. Schena³

¹Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, University Hospital of Parma

²Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Life and Reproduction Sciences, University Hospital of Verona, Verona, Italy

³Department of Neurological, Neuropsychological, Morphological and Movement Sciences, University of Verona, Verona, Italy

Introduction: DNA double-strand breaks (DSB) are one of the most severe lesions in eukaryotic cell lines, since DNA repair failure has been consistently associated with increased risk of genomic instability and related diseases, including cell death and cancer. Therefore, this study was aimed to investigate the effect of increasing bulks of aerobic exercise on DNA damage reflected by the number of DSB.

Materials and Methods: The study population consisted in 19 trained athletes (2 women and 17 men; median age, 41 years and range 27-56 years), who completed a 10-km and a 21-km runs under competitive conditions in two separate days and with a 3 weeks interval. Blood samples were collected at baseline (i.e., pre-run) and 3 hours thereafter (i.e., post-run). DSB were analyzed in human lymphocytes with automated AKLIDES® technology (Medipan GmbH, Berlin, Germany) and finally reported as numbers of cells with foci per 100 cells. Results were presented as median and interquartile range (IQR).

Results: The pre-run DSB were similar between the 10-km and 21-km runs (0.9; IQR 0.2-1.7 versus 0.8; IQR 0.0-2.3; $p=0.403$). The post-run DSB increased significantly after both the 10-km (2.9; IQR 1.0-5.7; $p=0.008$) and 21-km (8.4; IQR 4.4-16.6; $p=0.001$) runs, with the 21-km post-run increase being significantly higher than that of the 10-km run ($p=0.008$). The percentage of subjects with DSB >1.0 increased significantly after both the 10-km (14/19 versus 7/19; $p=0.025$) and 21-km (18/19 versus 8/19; $p=0.001$) runs. The resulting odds ratios (ORs) and 95% confidence interval (95% CI) for increased number of DSB after the runs were 4.8 (95% CI, 1.2-19.1) for the 10-km and 24.7 (95% CI, 2.7-225.6) for the 21-km, respectively.

Discussion: Besides well-established causes of DNA damage such as environmental exposure to irradiation, chemical agents or ultraviolet light, the results of this study show for the first time that the generation of reactive oxygen species during endurance running may increase the number of DSB in trained athletes, with a clear dose (of exercise)-dependent relationship.

P076

GENDER DIFFERENCES IN HYDRATION STATUS OF ADOLESCENT SOCCER PLAYERS AFTER TRAINING SESSIONS

I. Venuto¹, A. Buoite-Stella¹, G. Stel¹, S. Mazzolini¹, M.P. Francescato¹, S. Cauci¹

¹Dept. Medical and Biological Sciences, University of Udine, Udine, Italy

²Laboratorio Analisi d'Elezione, Azienda Ospedaliero Universitaria, S. Maria della Misericordia di Udine, Udine, Italy

Dehydration is a well known cause of reduced athletic performance. Several studies have examined hydration status of adult soccer players, but scarce information is available for adolescent players. Moreover gender differences in hydration and fluid balance in adolescent soccer players have not been studied.

We studied changes in hydration status in 16 years-old male and female soccer players including urinary data as markers of hydration and electrolytes status. Urine specific gravity threshold of ≥ 1.020 g/mL was applied to quantify hydration status. Additionally, urine sodium and potassium concentrations before and after 2 different training sessions were determined.

Participants were 6 males and 6 females young soccer players, baseline body weight was 66.8 ± 6.44 kg in males and 60.3 ± 7.43 kg in females. Weight of each participant was assessed and urine samples were collected just before and after 2 typical standard training sessions. In the first session participants consumed water ad libitum, whereas in the second session each participant drank the amount of water corresponding to 70% of sweat lost in the first session.

In the first session, in males weight loss was -1.1 ± 0.27 kg, percentage of total body water loss was $-1.6 \pm 0.35\%$, whereas in female weight loss was -0.25 ± 0.36 kg, percentage of total body water loss was $-0.43 \pm 0.67\%$. In the second session no statistically different values were observed. By overall data, males were more dehydrated than females ($P < 0.05$). Among males 83% had urine specific gravity ≥ 1.020 g/mL in the pre-training and 100% in the post-training. Among females 44% had urine specific gravity ≥ 1.020 g/mL in the pre-training and 50% in the post-training. Pre-session versus post-session comparison of urine electrolytes showed that the mean concentration of sodium was decreased (-48.8 ± 46.0 mmol/L) whereas potassium was increased ($+15.1 \pm 25.1$ mmol/L).

In conclusion, no severe dehydration ($>2\%$ body weight loss) able to affect athletic performance was observed in adolescent soccer players, however gender differences were noted being percent weight loss after training 3-fold higher in males than females. Gender differences should be further addressed in adolescent athletes to maximise sport performance and minimize health risks.

P077

BIOMONITORING OF METALS IN URINE OF AMERICAN FOOTBALL PLAYERS

S. Cauci¹, M. Tavano¹, R. Zaglia², M.P. Francescato¹, A. Colatutto²

¹Dept. Medical and Biological Sciences, University of Udine, Udine, Italy

²Laboratorio Analisi d'Elezione, Azienda Ospedaliero Universitaria, S. Maria della Misericordia di Udine, Udine, Italy

Low-dose exposure to environmental pollutants, including trace metals, in non-occupational setting has receiving increasing attention, especially for athletes due to the 10–20 fold increase in ventilation that occurs in exercising individuals. Thus, exposure of athletes to urban air pollution during outdoors sport activities may pose subjects to potential adverse health effects and/or reduction of athletic performances. Particulate matter (PM) is a main marker of air pollution. Usually concentration on PM <10 micron (PM10) is monitored. PM10 contains several air pollutants including inhalable metals.

A first morning urine sample was collected from each participant as baseline sample. Further, 9 samples of urine were collected after 2 hours of exercise training in 9 days with different air pollution. All urine samples were collected in a sterile polyethylene container. Metals analysis was performed by ICP mass spectrometry.

15 American Football players participated in the study. A total of 120 urine samples were analyzed.

We subdivided data according to PM10 levels: low, medium and high. Analysis of data according to PM10 pollution revealed that in days with high PM10 levels concentrations of Mn, Ni and Pb were significantly different, whereas As and Zn were unaffected.

Athletes exercising in outdoors conditions deserve special attention in biomonitoring due to large amount of air inspired during physical exercise. Indeed, athletes more than sedentary subjects are exposed to potential accumulation of many metals polluting air. Our study was the first (to our knowledge) to perform a simultaneous determination of several metals in urine of athletes after physical effort and according to air pollution.

P078

IMPLEMENTAZIONE DELLE REGOLE DI APPROPRIATEZZA: STUDIO DELL'EFFICACIA

S. Rosini, G. Andreani

Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, Osp. Carrara

Introduzione: Il 70% delle diagnosi mediche viene effettuata con l'ausilio di indagini di laboratorio. I dati della letteratura confermano che in percentuali rilevanti, dal 20 al 40%, gli esami vengono richiesti senza motivazioni o utilità per il paziente. Da ciò emerge sempre più la necessità di realizzare un progetto di intervento indispensabile sia per ridurre i costi dell'assistenza, sia per migliorare l'efficacia e l'efficienza della diagnostica di laboratorio.

Scopo del lavoro: l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di ottimizzare la richiesta di esami di laboratorio proveniente da tutti i Reparti della nostra AUSL, applicando un protocollo di regole sull'appropriatezza basato su Linee Guida e sull'Evidenza clinica e successivamente di quantificare il numero ed il costo degli esami risparmiati.

Materiali e metodi: dal 1° luglio 2013 il nostro Laboratorio ha introdotto una serie di regole utilizzando il software Prometeo (NoemaLife SpA) che prevede l'impostazione di Vincoli o Gating-rules all'inserimento dei test di laboratorio. Sono stati applicati 4 criteri di appropriatezza: incompatibilità con il sesso, incompatibilità con l'età, invarianza nel tempo e associazioni errate di test. In base a questi abbiamo configurato 52 regole utilizzando: blocco totale e warning motivation.

Da alcune regole, per motivi clinici, sono stati esclusi i seguenti reparti: nefrologia, neonatologia e pediatria.

Risultati: abbiamo messo a confronto il n° di esami effettuati nel periodo 1° luglio 2013-30 Giugno 2014 con quelli relativi al periodo 1° luglio 2012-30 Giugno 2013. Si è osservata una riduzione di 119.974 esami pari a circa il 30%. Le riduzioni più significative riguardano le seguenti regole: non è ammesso richiedere più di un marcatore tumorale per volta (-72%), non è ammesso richiedere la creatinina con l'urea (-34%), non è ammesso richiedere l'AST con l'ALT (-30%). Moltiplicando il n° di esami inappropriati con il costo associato al Tariffario abbiamo ottenuto un risparmio di euro 474.794 (circa il 35%). L'implementazione di questo sistema conferma il ruolo centrale del laboratorio che, governando i flussi in ingresso, evita sprechi dovuti all'esecuzione di test inappropriati, incongruenti con il quadro clinico o con risultati precedenti del paziente.

P079

INDAGINE SULLE MODALITÀ DI REFERTAZIONE DELL'ALBUMINA URINARIA NEI LABORATORI ITALIANIA. Terreni¹, A. Caldini¹, M.S. Graziani², G. Merlini³, A. Mosca⁴¹Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze²Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona³Tecnologie Biomediche e Biotecnologie, Ospedale Policlinico San Matteo, Pavia⁴Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

La misura dell'albuminuria (U-ALB) è essenziale per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con malattia renale cronica e per definire il rischio di malattie cardiovascolari. Nelle ultime linee guida "Kidney Disease Improving Global Outcomes" (KDIGO) si danno in proposito precise indicazioni per il laboratorio (1).

Nel 2007 due GdS SIBioC hanno effettuato una indagine conoscitiva riguardante aspetti preanalitici, analitici e postanalitici (2) e successivamente emanato alcune indicazioni (3).

Scopo della nostra indagine è verificare se i comportamenti dei laboratori riguardo alla U-ALB si siano modificati nel corso degli anni anche in ragione delle indicazioni fornite.

È stato distribuito un questionario di 9 domande, le risposte sono state 111 corrispondenti a circa il 7% dei laboratori italiani.

Per la misura dell'U-ALB l'80% degli intervistati richiede un campione spot, 4% il temporizzato del riposo notturno, e il 16% quello delle 24h; contro rispettivamente il 46%, 9% e 43% del 2007.

La seconda domanda, presente solo nel questionario 2015, chiedeva se viene misurata la creatinina urinaria: il 76% utilizza questo approccio, dato ottenuto sommando i laboratori che la misurano sempre, qualsiasi sia il tipo di campione e quelli che lo fanno solo per i campioni non temporizzati, mentre solo l'1% dichiara di non misurarla.

Va segnalato però che una percentuale non piccola (23%) non risponde alla domanda.

Il 98% dei laboratori esegue un CQI, di questi l'84% ad ogni seduta analitica, l'8% solo alla calibrazione, mentre il restante 8% a cadenze diverse. Nel 2007 erano l'85% e di questi il 60% lo eseguiva ad ogni seduta analitica, mentre il 40% a cadenze diverse.

Il 58% definisce l'analita come Albuminuria, U-Albumina o Albumina urinaria, mentre il 42% continua a utilizzare il termine microalbuminuria.

Complessivamente si può affermare che i comportamenti dei laboratori nel campione esaminato riguardo alla misura dell'U-ALB siano migliorati nel corso degli anni, ma che solo in parte siano in linea con le LG KDIGO.

1. KDIGO 2012. *Kidney Int Supp* 2013;3:1-150.

2. Graziani MS, Lo Cascio C, Caldini AL, et al. *Biochim Clin* 2007;31:290-6.

3. Graziani MS, Caldini AL. *Biochim Clin* 2011;35:127-30.

P080

INDAGINE SULLE MODALITÀ DI REFERTAZIONE DELL'ELETTROFORESI SIEROPROTEICA E DELLA PROTEINA DI BENCE JONES NEI LABORATORI ITALIANIA. Terreni¹, A. Caldini¹, M.S. Graziani², G. Merlini³¹Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze²Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona³Tecnologie Biomediche e Biotecnologie, Ospedale Policlinico San Matteo, Pavia

La diagnostica proteica riveste un ruolo centrale nel percorso di laboratorio della gestione del soggetto con Gammopatia Monoclonale (1). Scopo del lavoro è valutare a distanza di alcuni anni quanto le indicazioni scaturite dall'indagine del 2007 e le raccomandazioni del GdS proteine, hanno inciso sui comportamenti e sul percorso di armonizzazione della fase post-analitica.

È stato distribuito un questionario di 21 domande, le risposte sono state 103 corrispondenti a circa il 6% dei laboratori italiani.

Il 47% dei laboratori commenta l'assenza di anomalie riferibili a componenti monoclonali (CM); nel 2007 erano il 36%. Il 79% degli intervistati commenta anomalie qualitative diverse dalle CM, contro il 65% del 2007. Il termine CM viene utilizzato dall'86% dei laboratori, come nel 2007. Il 58% effettua la tipizzazione come "reflex testing", contro il 48% del 2007. Il 60% dei laboratori inserisce una nota in cui invita ad effettuare esami di approfondimento. Il 9% non quantifica mai la CM, contro l'11% del 2007. Il 58% dei laboratori quantifica sempre la CM se ben separata, il 31% solo se supera una determinata concentrazione. Se la CM non è quantificabile densitometricamente, il 15% misura l'immunoglobulina coinvolta, il 24% ne da una definizione semiquantitativa, il 31% referta l'impossibilità della quantificazione, mentre il 16% non da nessuna indicazione nel referto.

Il 75% dei laboratori se la Bence Jones (BJ) è negativa referta "Assente/Negativa", mentre il 7% come inferiore a xx mg/L. L'87% se la BJ è positiva referta usando un commento descrittivo, mentre l'11% in concentrazione. Il 57% degli intervistati riporta il metodo di ricerca della BJ. Per la quantificazione della BJ, il 17% usa la densitometria, il 26% la nefelometria o turbidimetria, mentre il 39% non effettua la quantificazione. Il 18% usa come unità di misura mg/24h, il 25% indica il metodo di quantificazione sul referto.

L'analisi dei questionari e il confronto col 2007 mettono in luce che un certo percorso è stato fatto sulla omogeneizzazione della modalità di refertazione, in quanto appare evidente come molti laboratori abbiano modificato il loro modo di operare, anche se molto lavoro resta ancora da fare.

1. Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.

P081

APPLICATION OF GRADE APPROACH TO MAKING EVIDENCE-BASED RECOMMENDATIONS ABOUT DIAGNOSTIC TESTS: THE CASE OF (-2)proPSAV. Pecoraro¹, L. Roli², T. Trenti¹¹Lab Tossicologia, Azienda AUSL, Modena, Italia²Lab Endocrinologia, Azienda AUSL, Modena, Italia

Background: The diagnostic studies can provide important information about the performance of tests, but they often provide low quality evidence for recommendations. We used the GRADE approach¹ to investigate the clinical utility of (-2)proPSA discriminating patients with prostate cancer (PCa) and to propose a valid method for making decisions in the clinical laboratory setting. Methods: We performed systematic electronic searches in Medline, Embase, Web of Science and Scopus as well as a list of reference literature for papers published until May 2015. Studies were included if they evaluated the diagnostic accuracy of (-2)proPSA in men with PSA included between 2.0 and 10 ng/ml. We analyzed, also, data about total PSA, %(-2)proPSa, freePSA, %fPSA and the prostate health index (phi). The studies selection, screening of the full texts and the data extraction were conducted independently by two authors, as well as the assessment of risk of bias using the QUADAS-2 tool. Grading the quality of the evidence was carried out using the GRADE method relating to directness, consistency and precision of the results. We used random effects models for the meta-analyses. All analyses were done using Stata 11 and Meta-Disc software. Results: We included seventeen studies enrolled 6912 patients. The pooled sensitivity of (-2)proPSA was 0.90 (95% CI 0.88-0.92) and specificity was 0.32 (95% CI 0.29-0.35), instead for tPSA the summary sensitivity and specificity were 89% and 24% respectively. Considering (-2)proPSA, the number of biopsy could be avoided was about 510 each 1000 men undergo biopsy. For fPSA and phi the sensitivity was 92% and 90%, and the specificity was 21% and 32% respectively. The majority of studies were judged at moderate risk of bias, instead the quality of evidences was low due to the presence of unexplained heterogeneity and the different cut-off used. Conclusions: The (-2)proPSA could be useful to identify men at risk of PCa, but its accuracy remains still uncertain. Applying the GRADE approach, the laboratory professionals have a valid tool for the interpretation of new test and to summarize the evidences considering all factors that could influence the utility of a diagnostic test.

1. Schunemann HJ, Oxman AD, Brozek J, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies. *BMJ* 2008;336:1106-10.

P082

MR-PROADRENOMEDULLIN IS A PROGNOSTIC MARKER IN THE RISK STRATIFICATION OF PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIAO. Porzio¹, M. Minieri¹, G.M. Agrippino², J. Legramante², M. Mastropasqua³, B. Susi³, S. Bernardini¹¹Department of Experimental Medicine and Surgery, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy²Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy³Emergency Department, Policlinico Tor Vergata, Rome, Italy

Background: The adrenomedullin precursor (MRproADM) is a helpful biomarker in the evaluation of the inflammatory response, and in the risk stratification strategy for Community Acquired Pneumonia (CAP). Poor evidences about its utilization in the Emergency Department (ED) have been so far obtained. The purpose of this study has been 1) to evaluate the possible role of MRproADM in the outcome and the risk stratification for patients affected by CAP in ED and 2) to compare it with other score indexes for disease severity.

Methods: We enrolled 81 patients at the Policlinico Tor Vergata (PTV) ED with suspected CAP diagnosis. Blood samples were collected to measure plasma levels of MRproADM by immunofluorescence assay (Kryptor System) and compare results to widely utilized clinical risk score, i.e. PSI (pneumonia severity index) and CURB65 (Confusion, Urea, Respiratory rate, Blood pressure, Age over 65). The patients were subjected to a follow-up period of 28 days to evaluate correlation between MRproADM and primary end point (deaths, need of invasive and noninvasive mechanical ventilation, need of intensive care unit admission) and secondary end point (length of stay). Results: A significant correlation between MRproADM levels and mortality was found ($p < 0,05$) using the cut-off of 1,75 nmol/L. MRproADM strongly correlates with both clinical scores CURB65 and PSI: the highest peptide level was observed more frequently into the highest PSI ($p < 0,01$) and CURB65 ($p < 0,01$) score classes. The mean value of the peptide in survivors was $1,28 \pm 1,32$ nmol/L whereas in nonsurvivors was $4,3 \pm 4,4$ nmol/L. 67% of nonsurvivors were located in the fourth quartile of the MRproADM levels whereas 78% of survivors had MRproADM levels below the cut-off threshold. Finally, MRproADM levels show a significant correlation with invasive mechanical ventilation (IOT) ($p < 0,05$), non-invasive mechanical ventilation (NIMV) ($p < 0,01$), ICU admission ($p < 0,05$) and length of stay ($p < 0,01$).

Conclusions: MRproADM is a reliable and easy to use prognostic marker in the initial screening of CAP patients. The peptide seems to provide a valuable help for emergency physicians in the early risk stratification of pneumonia-affected patients, both in terms of outcome and in the decision of the correct level of hospital care assistance.

P083

DETERMINAZIONE DELLA COPEPTINA IN PAZIENTI AMMESSI AL PRONTO SOCCORSO PER SINCOPE: RISULTATI DI UNO STUDIO PRELIMINARE

M.M. Mion¹, L. Schiavon¹, A. Casarotti¹, M. Zaninotto¹, S. Vigolo², G. Vettore², L. Babuin³, M. Plebani¹

¹U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italia

²Dipartimento di Emergenza e Urgenza, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova, Italia

³Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italia

La copeptina (COP), frammento C-terminale della provasopressina, è un biomarcatore correlato con i livelli individuali di stress oltre che utile nella diagnosi e nella prognosi di diverse patologie acute. In questo studio è stata valutata l'utilità della determinazione della COP in pazienti (pz) ammessi al pronto soccorso (PS) con sincope (diagnosi stabilita con criteri clinici), in particolare per l'identificazione di pz che necessitano di essere ricoverati e di pz a rischio di riammissione in PS per recidiva sincopale entro 90 giorni. I valori di copeptina non erano inclusi nei dati disponibili al medico del PS al momento della decisione clinica. Da ottobre a dicembre 2014 sono stati arruolati 25 pz >18 anni, escludendo i pz con dolore toracico, dispnea e patologie croniche allo stadio terminale. Per la valutazione dei risultati sono stati utilizzati i test di Mann-Whitney, Spearman e Fisher. Nella popolazione studiata (15M+10F; età mediana 78 anni, range 19-95) la COP mediana nei campioni di plasma raccolti all'ammissione (BRAHMS Copeptin us KRYPTOR; cut-off=12 pmol/L) è risultata pari a 119.6 pmol/L (range 3.4-1022.0). Non è stata rilevata una correlazione significativa tra COP ed età ($p=0.41$) né una differenza significativa nei valori di COP tra M e F ($p=0.64$). I livelli di COP nei pz ricoverati (mediana 170.4 pmol/L, range 21.0-1022.0) sono risultati significativamente più elevati di quelli osservati nei pz dimessi (mediana 13.7 pmol/L, range 3.4-569.7) ($p < 0.05$). Tutti i pz con COP <12 pmol/L ($n=5$) sono stati dimessi dal PS, mentre dei $n=20$ pz con COP >12 pmol/L, 12 sono stati ricoverati, 7 dimessi e 1 si è allontanato spontaneamente. 4 dei 25 pz arruolati si sono ripresentati in PS entro 90 giorni: 2 erano stati precedentemente ricoverati (COP >12 pmol/L) e 2 dimessi (1 pz con COP <12 pmol/L, 1 pz con COP >12 pmol/L). La COP era >12 pmol/L in 3 dei 4 pz riammessi in PS ma anche in 17 dei 21 pz non riammessi, risultando così non significativa la differenza tra le proporzioni ($p=1.00$). La COP non fornisce informazioni aggiuntive né per il rule-out né per il rule-in della popolazione studiata o nell'identificazione di pz a rischio di recidiva, risultando un marcatore di limitata utilità clinica nella valutazione e nella prognosi di pz con sincope in PS.

P084

CYTOKINES PROFILE IN HEALTHY AND G6PD DEFICIENT MEN

I. Campesi¹, S. Occhioni¹, D. Cambedda², B. Scanu², C. Carru², . Franconi Flavia¹, A. Pinna³

¹Department of Biomedical Sciences, University of Sassari - Laboratory of Sex-Gender Medicine, National Institute of Biostructures and Biosystems, Osilo, Italy

²Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Control Quality Unit – Universtiy Hospital of Sassari (AOUSS)

³Department of Surgical, Microsurgical, and Medical Sciences, Section of Ophthalmology, University of Sassari, Sassari, Italy, University Hospital of Sassari (AOUSS)

G6PD deficiency is the most common enzyme deficiency in humans, affecting about 400 million people. Recent studies, all carried out in Sardinia, have shown that the G6PD deficient patients have a lower risk of vascular pathologies, but the exact mechanisms are still unclear. The aim of this research project is to investigate cellular mechanisms, in order to understand how an enzyme deficiency widespread in the world's population may have a protective effect against vascular disease. In particular, it was analysed the release of TNF-alpha, IL-10 and MCP-1 in cultured monocytes and in monocytes-derived macrophages from control and G6PD deficient subjects both in basal condition and after 24 h stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and phorbol-myristate acetate (PMA), 2 well known to induce cytokines production. The analysis were performed using ELISA kits and following manufacturer's instructions. The data were analysed with OneWay Anova or rank sum test as all the experimental groups displayed a non-Gaussian distribution. 41 controls and 59 G6PD deficient men of mean age of 38.75 ± 13.31 and 40.96 ± 14.46 years, respectively (difference not statistically significant), were enrolled. It was shown LPS and PMA are both able to activate the release of cytokines in monocytes and macrophages of both experimental groups, but no significant differences were detected in the production of TNF-alpha, IL-10 and MCP-1 in cultured monocytes and in monocytes-derived macrophages from control and G6PD deficient subjects. According to what observed G6PD deficiency does not seem to significantly affect the inflammatory profile of affected subjects.

P085

IDENTIFICATION OF A NEW LEGIONELLOSIS HIGH RISK CATEGORY OF WORKERS: ROLE OF URINARY ANTIGEN TEST IN DISEASE DIAGNOSIS

D. Gestri

Lab. di Sanità Pubblica Area Vasta Centro, U.O. Biotossicologia, Azienda Sanitaria di Firenze

Legionella pneumophila is a Gram negative pathogen present in natural and artificial water systems, causing a pneumonia with high fatality rate. Transmission is usually through inhaling an aerosol from contaminated water supply networks. There is no evidence of inter-human transmission.

Legionella pneumophila disease (LD) diagnosis is usually carried out by positive result of urinary antigen test (UAT), an easy and fast to perform test, able to discriminate LD from other atypical and bacterial pulmonary injuries only if bacteria belong to serogroup 1.

In hospital central laboratory routine, screening of patients exhibiting pneumonia with UAT became a common practice in Italy.

Starting from a case of Legionella pneumonia, environmental analysis was carried out to find the infection source and to prevent new LD cases in the future. About diagnosis, UAT can't be the only test to confirm the disease because it's not sensitive enough and risks to underestimate LD incidence in general population.

Last year a 58-year-old Caucasian man, apparently healthy but cigarettes smoker, was admitted to the intensive care unit with fever and respiratory distress. Chest radiography showed areas of consolidation in both his lungs and confirmed the diagnosis of pneumonia. Following positive result for UAT, patient was treated with antibiotic therapy for two weeks and no bronchial aspirate was taken for microbiological examination.

After LD notification, environmental analysis was carried out in order to individuate the pathogen reservoir and then to proceed with appropriate disinfection. The water tank of his truck air conditioning system was contaminated by Legionella pneumophila to high levels ($> 10^5$ ufc/L). Bacteria belonged to serogroups 1 and 2-14.

Trucks air conditioning systems can be considered possible infection vehicles and professional drivers a high risk category of workers. Further studies are necessary to confirm this like a new LD exposition pathway; so, among drivers, clinical and environmental surveillance should be coordinated in order to prevent additional cases.

LD diagnosis, based on UAT only, underestimates LD incidence. Additional clinical tests, like bacteria isolation on bronchial aspirate and molecular typing, should be performed and become a routine procedure.

P086

UTILIZZO DI TELEFONI CELLULARI DEDICATI PER MIGLIORARE L'EFFICACIA DELLA COMUNICAZIONE DEI VALORI CRITICI

A. Cappellani, R. Brivio, M. Casati, S. Ippolito, V. Minolfi, V. Perlangeli, M.L. Carati

Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. San Gerardo, Monza

Introduzione: Fra i compiti del laboratorio c'è la comunicazione dei valori critici (VC) definibili come quei risultati che possono suggerire un pericolo immediato per la vita del paziente, qualora non si adottino appropriati interventi¹. Joint Commission International, fra gli standard finalizzati alla tutela della salute del paziente, richiede che la comunicazione dei VC sia tempestiva precisa e priva di ambiguità. Studi dimostrano l'efficacia della comunicazione automatizzata dei VC² ma da anni presso l'A.O. S. Gerardo di Monza la comunicazione di valori critici del Laboratorio Analisi Chimico Cliniche (4136 VC pari allo 0.1% del numero totale di test eseguiti nel 2014) è stata effettuata mediante chiamata telefonica da rete fissa a specifici numeri presidiati. Tipo, numero di VC ed efficacia della comunicazione sono stati monitorati per ogni singolo reparto con registrazione puntuale e analisi trimestrali dei dati che hanno evidenziato, nonostante la sensibilizzazione del personale, un elevato numero di mancate risposte telefoniche con un incremento percentuale negli anni (11.5% nel 2012 e 13.4% nel 2013) e conseguente riduzione dell'efficacia della comunicazione e quindi maggiori rischi per il paziente. Scopo dello studio: Valutare il miglioramento delle comunicazioni efficaci dei VC mediante l'utilizzo di telefoni cellulari dedicati.

Materiali e metodi: Individuazione dei reparti con il maggior numero di mancate risposte telefoniche e successiva fornitura di telefoni cellulari dedicati.

Risultati: La sperimentazione è iniziata nel Luglio 2014. Nei mesi successivi si è registrato un decremento significativo delle mancate risposte telefoniche totali, da un 13% di mancata risposta nel primo trimestre 2014 ad un 4% nel quarto trimestre, con conseguente incremento delle comunicazioni efficaci. Le valutazioni iniziali confermano tale andamento per il 2015.

Conclusioni: Nella nostra esperienza l'utilizzo dei telefoni cellulari ha migliorato la comunicazione dei VC.

1. Lundberg GD. When to panic over abnormal values. MLO Med Lab Obs 1972;4:47-54.

2. Piva E, Pelloso M, Penello L, et al. Laboratory critical values: Automated notification supports effective clinical decision making. Clin Biochem 2014;47:1163-8.

P087

INDIVIDUAL SEASONAL VARIABILITY OF ESSENTIAL AND TOXIC ELEMENTS IN URINE

G. Paglia¹, O. Miedico¹, A.R. Lovino², M. Tarallo¹, G. Astarita³, E. Chiaravalle¹, G. Corso²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Dip. di Chimica, Foggia, Italy

²Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italy

³Dept. Biochemistry and Molecular & Cellular Biology, Georgetown University, Washington DC and Waters Corporation, Health Sciences, Milford, MA, USA

Aims: The exposome is defined as the totality of all human environmental exposures from conception to death [1]. The aim of this study was to investigate the potential effect of seasonality on the urine excretion of toxic and essential elements. Moreover, we also evaluated the influence of a controlled diet on this potential seasonal variation.

Methods: 7 healthy participants (3 male and 4 female) were recruited based on age (from 23 to 28 years old) and BMI (from 18.8 to 29.1). Samples were collected (in the morning) in January, April, July and November. Three urine samples were collected before diet and after 4 days of iso-caloric balanced diet. We then monitored 19 essential and toxic elements in urines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Univariate and multivariate data analysis was then used to evaluate the influence of seasonality on the exposome.

Results: Principal component analysis (PCA) was used for data visualization. A strong cluster separated samples collected during summer from other seasons, and this separation was evident in both samples collected before and after the diet. Both toxic and essential elements resulted increased during summer. The brief period of diet had no influence on the urinary element concentrations.

Conclusions: Our findings demonstrate the influence of seasonality of the urine exposome by showing how many elements had increased concentration during summer. We propose that in future studies reference intervals for elements in urine should be presented considering the season of collection.

1. Rappaport SM, Smith MT. Epidemiology. Environment and disease risks. Science 2010;330:460-1.

P088

HARMONIZATION OF REPORTING FOR DIAGNOSTIC ACCURACY STUDIES IN MEDICAL LABORATORY: AN EVIDENCE-BASED APPRAISAL

V. Pecoraro¹, R. Banzi², T. Trenti¹

¹Lab. di Tossicologia, Azienda AUSL Modena, Modena

²Lab. Politiche Regolatorie del Farmaco, IRCCS Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

Background: To improve the reporting of diagnostic accuracy studies, Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) checklist was published.¹ We analyzed the compliance to STARD checklist for diagnostic accuracy studies focusing on laboratory medicine.

Methods: We searched for journals formally adopting the STARD in the "Medical laboratory technology" category of ISI Web of Knowledge database. We identified studies reporting an estimate of accuracy published in 2014. For each article, the number of reported STARD items was counted, and the reporting was classified as poor (less than 10 items reported), acceptable or optimal (more than 20 items reported).

Results: Only three of 31 journals listed in the field of laboratory medicine (Clinical Chemistry; Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and Annals of Clinical Biochemistry) mention the STARD checklist in their instruction for authors. We evaluated 24 studies published in journals adopting the STARD and, as comparison, seven studies published in *Chimica Clinica Acta*. Overall, the median number of items reported was 11 (range: 5-18). None of the studies comply with the entire checklist. Reporting was judged poor in 15 of 31 studies (48.4%), and acceptable in 14 studies (51.6%). Thirteen studies (42%) reported details about included patients, 15 studies tabulated the diagnostic accuracy results, and only one study reported the flow chart. The most frequent reported domains were on index test and reference standards. Papers often lacked an accurate description of the population enrolled. Comparison between quality of reporting in journals adopting or non adopting the STARD checklist will be presented.

Conclusions: Laboratory medicine journals do not widely adopt the STARD checklist. Not all the STARD items may be adequate for the reporting of the studies usually published in these journals. Preliminary data suggest that the employment of the STARD checklist improves the quality of reporting. The lack of accurate description of the clinical characteristics of the participants may limit the usefulness of results in practice.

1. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. STARD group. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Clin Chem Lab Med 2003;41:68-73.

P089

LAB TESTS APPROPRIATE PRESCRIPTION: LAB AND FAMILY DOCTORS AN EFFECTIVE DIALOGUE AIM

A.M. Basile¹, R. Laricchia¹, C. Modica², C. Mastrorocco³

¹Centro Prelievi UOC Patologia Clinica
Osp.Miulli,Acquaviva delle Fonti (BA)

²Medicina di Base

³Traduttrice freelance

The EBM and the resources optimization brings to necessary reflections about the appropriate prescription of laboratory tests. The experience gained at the Blood drawing Department- with patients outside the Division of Clinical Pathology at MIULLI Hospital- showed the extreme importance of this matter, it has become a subject of study. The goal is to analyze the external requests with haematochemical tests prescriptions, referring to 2014, basing on the established literature, focusing on prescriptive errors and what is believed to be unnecessary or inappropriate for the diagnostic-therapeutic purpose.

Materials and methods: In 2014 the Blood drawing Center provided approximately 834.987 examinations for 59058 patients. On 38% of the requests there were more than 8 tests prescribed; 11% of the requests had errors on the patient exemption code; the 27% of the requests showed incorrect prescription (e.g. factor v of coagulation instead of factor v leiden, HCV RNA instead of antibodies anti HCV, etc.); 8% of them had test prescriptions repeated in the same routine; 17% contained excessive requirements e.g. HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HbCAb, HBcAb IgM / TSH, FT3, FT4, Tg, Tg Anti, Anti TPO/ANA, ENA, Anti DNA, AMA.

Results: The results show a huge inconvenience for patients and an excessive health cost, also because of the lack of reflex tests in the regional price list ("Gazzetta Ufficiale" n. 23 of 28 January 2013).

Conclusions: Based on what we have collected, an intervention project was implemented. It involves a review of prescriptions, through the collaboration of hospital and family doctors (formative events, online test lists). In addition, at the Blood drawing Center, all the requests not in compliance with regulations are integrated with additional requests from the Division of Clinical Pathology, prior the Medical Specialist request verification and a signed authorization by the patient, in order to reduce their discomfort and reduce the support costs.

Pradella M. Diagnostics Appropriateness: medical competence. Riv Med Lab-JLM, Vol. 5, No.2, 2004.

Cappelletti P. Practicing appropriateness in Lab Medicine. Instructions for Use. Riv Med Lab 2013;9:55-60.

P090

PROCALCITONIN (PCT) FOR AN APPROPRIATE ANTIBIOTIC THERAPY

A.M. Basile¹, P. Maselli¹, P. De Francesco², C. Mastrorocco³

¹Centro Prelievi UOC Patologia Clinica
Osp.Miulli,Acquaviva delle Fonti (BA)

²Medicina di Base

³Traduttrice freelance

Introduction: The determination of the PCT has been proposed as a marker to differentiate bacterial from viral infections or from other non-infectious of Systemic Inflammatory Response Syndrome.

What studied in the following work is related to the ability of PCT to assume a role as an aid to improve the appropriateness of the use of certain antibiotics for outpatients through: the differential diagnosis of inflammatory illness and fever of unknown origin (FUO), the monitoring critically ill patients, the prognostic analysis and the therapeutic control of sepsis.

Materials and methods: The Blood Drawing Centre for external patients of the Division of Clinical Pathology at MIULLI Hospital has started several collaborative projects with the family doctor of the territory. In 2014, 89 PCT tests were performed on outpatients with the following results (ng/ml): 32 patients had values <0.05; 51 patients had values <0.5; 2 patients had values >0.5-<2.0; 2 patient had values >2.0-<10.

Results: The results show that the rate of sepsis and bad infections in these patients is rare and the low cut-off of PCT (eg. <0.25 ng / mL) provides a secure level of exclusion of sepsis, considering the high negative predictive value of low concentrations of PCT. The PCT for patients with acute respiratory infections and exacerbations of COPD, readily available, has contributed to the decisional process about the urgency of antibiotic treatment in addition to monitoring the success of therapy.

Conclusions: Measuring PCT levels for decisions on antibiotic therapy in patients with respiratory tract infections and sepsis, appears to reduce the exposure of the same antibiotic, avoiding the risk of increased resistance. Therefore it is believed that such a determination can be taken to decide the manner and the opportunity of antibiotic treatment in this kind of patients. However we should remember that the test is quite expensive (not included in the regional price list) and the clinical experience in the field is still inadequate and limited to hospitalized patients.

Piebald P, Balboni F, Piazzini T, et al. Clinical Biochemistry 2013;37:15-22.

Schuetz P, Chiappa V, Briel M, et al. Arch Intern Med 2011;171:1322-31.

P091

HBV VACCINATION PROGRAM IN ITALIAN BLOOD DONORS: EFFECTIVENESS AND POTENTIAL THREAT OF VACCINATION FAILURES TO THE SAFETY OF BLOOD SUPPLY

M. Spreafico¹, D. Girgenti¹, L. Raffaele¹, F. Fumagalli Maldini¹, C. Galli², B. Foglieni¹, A. Berzuini¹, I. Guarnori¹, D. Prati¹

¹Department of Transfusion Medicine and Haematology, Azienda Ospedaliera della Provincia di Lecco, A. Manzoni Hospital, Lecco, Italy

²Scientific Affairs, Abbott Diagnostics, Roma, Italy

Background: In Italy, vaccination against HBV in newborns, extended to 12-year-old children, was mandated in 1991. Recombinant HBsAg of A2 genotype, aimed to protect across all genotypes, is used. However, occasional reports of infection with non-A2 HBV genotype in vaccinated blood donors presenting with occult HBV infection (OBI: HBsAg negative, HBV DNA positive) raised questions about the broad genotype efficacy of vaccines. OBI is a potential risk factor for post-transfusion hepatitis, hepatocellular carcinoma, cirrhosis and HBV reactivation. The aim of the study was to investigate the efficacy of HBV vaccination in Italy, where HBV D genotype is prevalent. **Methods:** Italian blood donors vaccinated at 12 years of age (group A) or in infancy (group B) were enrolled and tested for HBsAg, anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs titre and HBV DNA. Dilution and avidity tests were performed on anti-HBc positive samples to confirm true positive results. The persistence of anti-HBs according to the time elapsed from vaccination was also evaluated.

Results: Out of 1055 blood donors, 295 were vaccinated in infancy (28%) and 760 (72%) at 12 years. No anti-HBc positive result was found in group B, whereas 5 donors (0,7%) in group A were anti-HBc positive, HBsAg and HBV DNA negative ($p=0.3$). Avidity testing confirmed the anti-HBc positivity in 3/5 donors (anti-HBc specificity: 99.72%), all with high avidity. One of them, vaccinated at 13 years of age, was also anti-HBe positive, with undetectable circulating HBV DNA. Anti-HBs titres were <10 IU/mL in 381 (36%) subjects, corresponding to 64% of donors vaccinated in infancy ($n=189$) and 25% of vaccinated at 12 years of age ($n=192$). Age at vaccination was an independent predictor of low anti-HBs titer ($R^2: 0.048$; 95% CI: 11.14-19.24) by logistic regression analysis.

Conclusions: In Italy, HBV vaccination program in newborns seems to be effective to ensure protection against HBV infection. A low percentage of anti-HBc positivity among donors vaccinated at 12 years of age was found, but further studies are needed to clarify its origin and to investigate the implications for transfusion safety. Vaccination in adolescence results in more prolonged immunogenicity than vaccination in infancy, reflecting the a more developed immune system.

P092

VALUTAZIONE METABOLICA DELLA CALCOLOSI RENALE

G. Cangiano¹, E. Di Maina¹, G. Buccino¹, A. Errico¹, P. Improta¹, P. Raffio², M.M. D'Ambrosio¹, M. Iappelli¹, M. Paracuello³, M. Terribile⁴, M. D'Amora⁵, A. Sarappa¹

¹Lab. di Patologia Clinica, P.O. dei Pellegrini, ASL NA 1 Centro

²Lab. di Patologia Clinica, P.S.I. Napoli EST, ASL NA 1 Centro

³Ortopedia, A.O. San Paolo, Milano

⁴Nefrologia e Dialisi, P.O. dei Pellegrini, ASL NA 1 Centro

⁵Lab. di Patologia Clinica, P.O. S.M. del Popolo degli Incurabili, ASL NA 1 Centro

Premessa: Lo studio metabolico del rischio nefrolitiasico si effettua da almeno nove anni e viene richiesto dalle Nefrologie dell'ASL NA 1 Centro, da quelle Universitarie (SUN e Federico II) e dall'Utenza esterna (Campania e regioni vicine). Si dosano analiti urinari delle 24h (calcio, ossalato, urato, fosfato, citrato, sodio, potassio, cloro, magnesio, ammonio, cistina, urea, creatinina, proteine, pH, volume) e della mattina (calcio e creatinina). Si determinano inoltre le supersaturazioni renali relative (SSR) per calcio ossalato (SSR CaOx), calcio fosfato monoacido (SSR CaHPO4), acido urico (SSR UA) e cistina (SSR Cys), estrapolate con opportuno software.

Scopo dello studio: si valuta il comportamento delle SSR sopra citate al variare dei diversi analiti urinari. Si analizzano 467 campioni urinari afferenti al nostro laboratorio dal gennaio 2013 al maggio 2015.

Materiali e metodi: gli analiti si dosano su Cobas 6000 Roche ad eccezione di ossalato, citrato, solfato e cistina che vengono determinati su Viva E Siemens. Solfato e cistina sono dosaggi non commercializzati ed i reagenti sono preparati in laboratorio. L'acidità si rileva con pHmetro Hanna e tutte le SSR si estrapolano con il software Litho Risk.

Risultati e conclusioni: il 44,8% dei campioni non presenta SSR aumentate mentre la rimanente quota evidenzia aumenti degli SSR così rappresentati: UA 28,7%, CaHPO4 23,3%, CaOx + UA 15,9%, CaHPO4 + CaOx 14,3%, CaOx 8,1%, cistina 7,4%, altri 2,3%. SSR UA>1: solo il 18,9% dei casi evidenzia uricuria >700 mg/die mentre l'83,6% presenta un valore di pH<5,6. SSR CaHPO4 >2: il pH trovato è risultato >6,0 per il 90,5% dei campioni; nell'87,6% dei casi si riscontra fosfaturia <1100 mg/die e nel 73,3% calciuria >200 mg/die. SSR CaOx >5: nella maggioranza dei campioni analizzati, ossalato, citrato, potassio e volume urinario presentano dei valori al di sotto del valore soglia. Dai dati ottenuti si evidenzia che i valori di SSR scaturiscono solamente dalla elaborazione contemporanea di analiti precipitanti, pH, volume, inibitori e promotori e pertanto è difficile se non impossibile predire il rischio nefro-litiasico con i soli dati urinari delle 24h.

Cangiano G, Latte A, Di Maina E, et al. Informatizzazione di laboratorio del rischio nefrolitiasico. *Biochim Clin* 2012;36:602.

P093

ANALISI DELLA DEFORMABILITA' ALLA NANOSCALA DI GLOBULI ROSSI ESTRATTI DA PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE DI TIPO II

C. Rossi¹, G. Ciasca², M. Papi², M. Chiarpotto², V. Palmieri², G. Nocca³, G. Maulucci², M. De Spirito²

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Istituto di Fisica, Università Cattolica S. Cuore, Roma

³Istituto di Biochimica e Biochimica clinica, Università Cattolica S. Cuore, Roma

Scopo: Il diabete mellito è un disordine metabolico caratterizzato da uno stato di iperglicemia; gli eritrociti rimangono in un ambiente iperglicemico per il loro intero ciclo vitale e pertanto sono soggetti a modificazioni che ne influenzano le proprietà di deformabilità. Molti risultati sperimentali evidenziano che gli eritrociti estratti da pazienti diabetici presentano una maggiore rigidità (quantificata mediante il modulo di Young E) rispetto ai controlli. In questo studio abbiamo investigato mediante misure di Microscopia a Forza Atomica (AFM) le proprietà biomeccaniche degli eritrociti estratti da pazienti affetti da diabete di tipo II allo scopo di identificare nuovi markers biomeccanici della patologia.

Metodi: Il sangue in EDTA è stato prelevato da 15 donatori e da 5 pazienti diabetici. Gli eritrociti sono stati disciolti in fisiologica e depositati su una petri-dish rivestita di polilisina. Le misure sono state effettuate utilizzando un microscopio AFM JPK Nanowizard III.

Risultati: La variazione del modulo di Young in funzione della velocità di indentazione (1-25 $\mu\text{m/s}$) è stata studiata per controlli e pazienti. A basse velocità di indentazione (1 $\mu\text{m/s}$) entrambi i pool mostrano un valore di E di circa 1.8 kPa. All'aumentare della velocità si osserva, in entrambi, i casi una crescita monotona fino a 3 kPa. Tra 4 e 15 $\mu\text{m/s}$ E cresce più rapidamente nei campioni patologici che nei controlli.

Conclusioni: Evidenze sperimentali hanno mostrato che gli eritrociti dei pazienti affetti da diabete mellito sono più rigidi rispetto ai controlli. In questi studi i globuli rossi vengono approssimati a corpi perfettamente elastici trascurando il contributo delle forze viscosoelastiche. In questo lavoro abbiamo valutato la risposta viscoelastica dei globuli rossi; le nostre misure svelano che la maggiore rigidità degli eritrociti in condizioni patologiche è solo apparente. La principale differenza tra il caso patologico ed i controlli sembra infatti risiedere nella risposta dinamica alle deformazioni. Questi risultati hanno importanti ricadute nella ricerca di markers biomeccanici della patologia e dimostrano che lo studio della risposta dinamica alle deformazioni permette di ottenere informazioni più accurate rispetto alla misura del modulo di Young in condizioni statiche.

Pretorius E, Kell DB. Integr Biol (Camb) 2014;6:486-510.

P094

COMPARISON OF TWO MOLECULAR ASSAYS TO DETECT AND GENOTYPE HUMAN PAPILLOMAVIRUS

G. Bertacca, I. Giannelli, E. Bonomi, M. Friggeri, A. Palagi, D. Ricci, S. Lombardi

SSD Analisi ChimicoCliniche ed ImmunoAllergologia, USL1 Massa e Carrara, Italy

Genital human papillomavirus (HPV), the causative agent of cervical cancer, is responsible for one of the most common sexually transmitted infections (Ghittoni R. et al. 2015).

To detect and genotype HPV DNA we tested two different kits: HPV Sign (Diatechpharmacogenetics) and EUROArray HPV (EUROIMMUN).

DNA was extracted from cervical swabs and male semen and urine samples using QiaSymphony DSP Virus/Pathogen kit (Qiagen).

HPV Sign is based on real time PCR. The assay targets a hypervariable region within the L1 gene. The resulting melting curve was analyzed and positive samples were sequenced using the PyroMark ID System (Qiagen). The sequence is aligned to an HPV library and the viral type assigned by the software IdentiFire SW (Qiagen).

EUROArray HPV kit is based on microarray technology. The assay targets the viral oncogenes E6/E7 and detects 30 HPV subtypes (18 high and 12 low risk types). DNA sample is amplified and then hybridized on a microarray harboring 72 spots of specific ssDNA probes. Every spot corresponds to one of 30 HPV types or serves as internal control. The final evaluation is performed automatically using the microarray scanner and the EUROArraySCAN software.

We analyzed 73 samples: 63 samples from cervical scraping, 8 semen and 2 urine male samples. Using HPV Sign 9 samples resulted negative; 37 HR HPV; 18 LR HPV; 1 multiple infection and in 8 samples the genotype was not identified because of low signal PCR (NI).

EUROArray HPV kit detected 17 negative samples and 1 sample was without cell DNA. All positive samples were genotyped: 44 HR HPV; 11 LR HPV; 29/55 positive samples showed multiple infections.

Concordance for at least one genotype was detected in 46 samples; if HR and LR classification is considered the concordance increases to 49 samples. 10/73 samples are HPV Sign positive/EUROArray negative and 2/73 are EUROArray positive/HPV Sign negative. 11/73 samples are positive with both tests but with discordant genotypes. The two different HPV detection assays show a concordance of 67%; HPV Sign detects a higher number of positive samples (10/73) among EUROArray negative results; EUROArray HPV assay is more efficient in detecting multiple infection (29/73 vs 1/73).

P095

OBSERVATIONAL STUDY TO ASSESS THE COMPLIANCE TO THE CLSI GP41-A6 GUIDELINES FOR BLOOD SAMPLING PROCEDURES DURING THE COMMON PRACTICE IN THE HEALTH DISTRICT OF SASSARI

M. Boi¹, P. Chirra¹, E. Sorrentino¹, P. Mele¹, V. Ventura¹, V. Bulla¹, B. Porcu¹, S. Sotgia¹, A. Zinellu¹, C. Carru²

¹Department of Biomedical Sciences, University of Sassari

²Control Quality Unit, University Hospital of Sassari (AOUSS)

Introduction: The harmonization process in laboratory medicine is not a simple matter. Among the different steps that should be addressed, we focused attention on pre-analytical phase, in particular the sample collection process. The aim of our study was to verify the venous blood sampling procedures in every public structure present in the city of Sassari to evaluate compliance to the guidelines and to identify main differences between various collectors.

Methods: Adapting a checklist proposed by an interesting recent article (Simundic AM, CCLM 2014), we drafted a 28 items checklist based upon CLSI GP41-A6 guidelines and SIBioC recommendations on venipuncture practice. Using the checklist we trained different observers to evaluate 10 Professional Nurses operating in the following structures: Centro Prelievi dell'AOUSS, Laboratorio Generale, U.O. di Malattie della Coagulazione del SS Annunziata, poliambulatorio "Antonio Conti", Poliambulatorio di Sassari. It should be noted that the 10 phlebotomist were not informed on the nature of the observation, and were examined for 10 consecutive samplings in a single day, to assure an unaltered representation of their procedures.

Results: The main abnormalities that we found were: patient identification (Q2) 66%, labelling tubes (Q3) 65%; asepsis procedures were not respected as soon as expected: hands hygiene (Q5) 15%, fresh new non-sterile gloves (Q10) 16%, avoid touching venipuncture site after disinfection (Q13) 49%. Moreover, information on patient conditions (Q6) were obtained only in 34% and tourniquet removal as soon as blood flow in the tube (Q15) occurred in 55%. Collectors register their identity (Q28) only in 20%.

Conclusion: Data analysis revealed a low compliance to international guidelines for blood sampling procedures, with many differences both inter and intra-health center. Particular attention should be given to patient identification procedure, respect of asepsis, and phlebotomist registration (relevant for the continuous monitoring of the sampling procedure). We think that the formulation and diffusion of a standardized procedure, that allows uniform venous blood sample collection, is a key step along the way to improve harmonization within laboratory medicine.

P096

OBSERVATIONAL STUDY ON THE COMPLIANCE TO THE CLSI H3-A6-GUIDELINES FOR A CORRECT PERIPHERAL VENOUS SAMPLING PROCEDURE IN THE HEALTH DISTRICT OF SASSARI: "RISK MANAGEMENT ANALYSIS"

P. Chirra¹, M. Boi¹, E. Sorrentino¹, P. Mele¹, V. Ventura¹, V. Bulla¹, B. Porcu¹, A. Bitti², S. Sotgia¹, A. Zinellu¹, C. Carru³

¹Dept. of Biomedical Sciences, University of Sassari

²Laboratory Department, SS Annunziata Hospital, Sassari (ASL 1 SS)

³Dept. of Biomedical Sciences University of Sassari, Control Quality Unit – University Hospital of Sassari (AOUSS)

Introduction: Suitability and Acceptability, during preanalytical phase blood-sample, are essential in the determination of a trusted clinical date. As well known, the greatest troubles in preanalytical phase are frequently associated to procedural type variables and not to physiological one.

Aim of this work is to define the compliance degree of the Total Quality Assessment protocols in the Health District of Sassari.

Methods: Structured on a probabilistic risk analysis and management system, it was prepared a survey form of sample tasks in the centers of SS-Health-District. The form, developed by standards set in I.G.L.-CLSIGP26-A6, was designed to highlight any major associated trouble to imperfect peripheral venous blood sampling (Simundic AM, CCLM 2014),

The Probability that a critical event is present and the associated severity event are the key variables used to assess a more accurate data control system.

In this work the probabilistic analysis of the variables defines the potential risk value.

This data is important to define, starting from a correct sampling practice, the compliance level and project system to make a data box useful to compare, over time, performance and improving tasks levels in sampling centers.

This results allow us to quantify the importance of a defect or a trouble occurred during the sample collection.

Results: As expected, all the variables identified are procedural type and in most time the "vices" of sampling are linked to high severity levels. The values of Probability and Severity noted for critical questions (Qx) are: Q2= P2-S3 (patient identification); Q3= P2-S4 (patient control); Q6 = P3-S3 (optimal conditions check for sampling procedure); Q24= P3-S5 (labelling step); Q28= P3-S4 (recognition).

The extrapolated potential risk value for critical questions was: Q2= 6; Q3= 8; Q6= 9; Q24= 15; Q28= 12.

Conclusions: From the data it's seen that the potential risk values are low for Q2 and Q3, mean for Q6 and Q28 and high for Q24.

In conclusion, the data value risk linked permit to estimate not like application procedures.

This is basic in order to standardize the management of procedural type variables in FPA during the Assessment Quality processes.

P097

UN NUOVO APPROCCIO ALLA DIAGNOSI DEL DEFICIT DI α -1-ANTITRIPSINA (AATD)

F. Coghe¹, A. Gigante¹, P. Ferraguti¹, R. Faa¹, M. Pautasso¹, G. Orrù², A. Scano², A. Piras⁴, B. De Magistris⁴, A. Calvino⁴, S. Fais², G. Serreli⁴, R. Cappai¹, F. Puggioni¹, P. Coni³, G. Faa³

¹Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia AOU di Cagliari

²Laboratorio SPOKE Sequenziamento AOU di Cagliari

³U.O. di Anatomia Patologica AOU di Cagliari

⁴Università di Cagliari

Introduzione: L' α -1-Antitripsina (AAT) è una proteina della fase acuta dell'infiammazione con peso molecolare 52 kD, sintetizzata dagli epatociti. Il gene che codifica per questa proteina si trova sul cromosoma 14 e può dare origine a oltre 100 varianti alleliche, di cui solo 30 sono interessanti sotto il profilo patologico. Nel siero è presente con valori oscillanti da 90 a 200 mg/dl e rappresenta il 95% delle α -globuline del normale protidogramma; la sua sintesi è stimolata dall'IL 6 e dall'Oncostatina-M. Scopo del nostro lavoro è valutare se sia possibile individuare un cut-off decisionale per la popolazione della Sardegna che faciliti la diagnosi di deficit di AAT.

Materiali e metodi: sono stati esaminati 5305 tracciati elettroforetici e si sono selezionati 77 casi in cui vi era un picco α 1 ridotto. Sui sieri dei pazienti selezionati si sono dosati l'AAT, la PCR-H e la VES. I dosaggi quantitativi di AAT e PCR-H sono stati effettuati su analizzatore Siemens BN-Prospec mediante metodo nefelometrico.

Risultati: I tracciati elettroforetici comparati con i dosaggi dell' α -1-Antitripsina, dimostrano che è necessario modificare il cut-off di rilevamento del picco α passando dall'1% a 1,5%, che determina un aumento della sensibilità del metodo. Inoltre, essendo AAT una proteina della fase acuta, il suo cut-off decisionale doveva essere modificato e bisognava considerare due gruppi di pazienti, uno con PCR-H normale ($\leq 1,0$ mg/dl) e l'altro con PCR-H mossa ($> 1,0$ mg/dl). In questo modo si recuperava il 77,2 % dei pazienti che altrimenti venivano persi se si manteneva il cut-off decisionale previsto per la popolazione normale (> 90 mg/dl).

Conclusioni: Il nostro studio ha dimostrato che nel caso del deficit dell'AAT, è necessario modificare i cut-off decisionali relativamente ai valori minimi di alfa 1 globulina dosabile nel siero dei pazienti. Inoltre, il tracciato elettroforetico può essere considerato un ottimo sistema di rilevamento dei pazienti carenti, a condizione che si innalzi il valore minimo di rilevamento da 1,0% a 1,5% nel caso del picco elettroforetico alfa.

Faa G. Alpha-1-antitrypsin deficiency: the need of a new diagnostic algorithm for improving the diagnostic ability of perinatologists and pediatricians. JPNIM 2015.

P098

A RAPID ANALYSIS OF PURINE CATABOLIC PRODUCTS IN PHYSIOLOGICAL FLUIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

M.C. Gueli

Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNEC), Università degli Studi di Palermo

The degradation routes of purines to urate depends on the conversion of hypoxanthine (HX) and guanine (G) to xanthine (X) and on its degradation to uric acid (UA). X concentration in blood and urine increases in several clinical conditions: hereditary xanthinuria (1), or decreased hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase activity (Lesch-Nyhan syndrome), after administration of allopurinol. In addition, elevated serum X levels, in general, can indicate tissue depletion of ATP. Patients with hereditary xanthinuria or secondary xanthinuria are characterized by high levels of X and sometimes HX in blood and urine, while the concentration of urate is very low and often produces X stones in their urinary tracts.

We proposed a rapid method based on capillary electrophoresis (CE) for screening purine salvage pathway disorders and hereditary orotic aciduria.

A Model Prime Vision System IV (Europhor Instruments, FR); the spectral range was monitored from 195-320 nm; at 25°C and 20 κ V; the capillary was 500 nm x 50 μ m I.D. The m.f. was a 0.2 M sodium tetraborate decahydrate-boric acid buffer, pH 8.2. Stock standards: 10 mg of X, adenine (A), G, adenosine (AS), guanosine (GS), inosine (I), HX, UA and orotic acid (OA) were dissolved in 100 ml of NaOH 0.1 N. Working standards: the stock standard was diluted ten-fold in water or serum. An aliquot of 100 μ l of serum or urine was vortex-mixed with 200 μ l of acetonitrile, centrifuged at 14 000 g, 5 min and the supernatant was injected into the capillary.

The elution order in the Electropherogram was: A/G/ I/ AS/ HX/ GS/ X/ UA/ OA. Peaks in serum or urine were identified according to the electrophoretic mobility and spiking the sample with standards and using the absorbance spectrum of each compound that is very helpful for peak confirmation. The CE method is much more rapid than the HPLC methods without the usual problems, such as high pressure and the need for solvent gradients or expensive columns. The development of this rapid, accurate and reproducible CE method, provided the impetus for its application to many physiological fluids such as plasma or serum, urine and tissues too in the early diagnosis of inherited disorders of the purine metabolism and urea cycle.

Seegmiller E. Am J Med 1968;45:780-3.

P099

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI CISTEINA E TAURINA IN SOGGETTI SARDI G6PD CARENTI

B. Scanu, E. Sotgiu, S. Assaretti, D. Arru, D. Cambedda, E. Pisanu, S. Ena, A. Baralla, A. Zinellu, C. Carru

Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari - Servizio Controllo di Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari (AOUSS)

La taurina e la cisteina sono due aminoacidi caratterizzati dalla presenza di un atomo di zolfo nella loro struttura. La taurina, sintetizzata a partire dalla cisteina in presenza di vitamina B6, risulta importante nel mantenimento dell'omeostasi fisiologica e agisce come agente antiossidante. È coinvolta inoltre nella sintesi degli acidi biliari.

La cisteina è un aminoacido non essenziale derivante dalla metionina, convertita in omocisteina e, successivamente, in cisteina.

Gli aminoacidi solforati sono importanti per la sintesi del glutatone, un potente antiossidante.

Lo scopo del lavoro è quello di analizzare taurina e cisteina, marcatori biochimici di aterosclerosi e stress ossidativo, nel plasma di una popolazione di individui G6PD carenti, al fine di verificare l'ipotesi di un ridotto rischio aterogenico.

Le due molecole sono state misurate in elettroforesi capillare con LIF detection.

L'analisi è stata eseguita in capillari in silice fusa rivestita lunghi rispettivamente 47 e 57 cm e 75 µm di Ø. Per permettere la rilevazione in fluorescenza gli analiti sono stati precedentemente derivatizzati con FITC (taurina)[1] e con 5-IAF (cisteina)[2].

Le concentrazioni di taurina sono risultate comprese tra 34,9 e 255,6 µmol/l nella popolazione di controllo (mediana=54,9 µmol/l) e 34,2 e 241,8 µmol/l nella popolazione patologica (mediana=59,4 µmol/l), p-value=0,0561.

L'analisi delle concentrazioni di cisteina nelle due popolazioni (mediamente 295,2±45,2 µmol/l nei sani e 310,5±49,7 µmol/l nei patologici), p-value=0,0169.

L'analisi dei dati mostra una variazione significativa nei livelli di cisteina che è maggiore nei soggetti patologici, che si ripercuote in un incremento, sebbene non significativo, anche dei livelli di taurina. Il fenomeno osservato potrebbe essere dovuto ai bassi livelli di GSH riscontrati nei soggetti G6PD carenti che determina un accumulo del precursore cisteina.

1. Zinellu A, et al. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food application. *Amino Acids* 2009;36:35-41.

2. Zinellu A, et al. N-methyl-D-glucamine improves the laser-induced fluorescence capillary electrophoresis performance in the total plasma thiols measurement. *Electrophoresis* 2003;24:2796-804.

P100

QUANTIFICAZIONE DI GLUTATONE E ERGOTIONEINA SU SANGUE INTERO TRAMITE ELETTROFORESI CAPILLARE E UPLC

D. Arru, E. Sotgiu, A. Baralla, D. Cambedda, E. Pisanu, S. Assaretti, M. Pinna, A. Zinellu, C. Carru, S. Sotgia

Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari - Servizio Controllo di Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari (AOUSS)

Il glutatone (GSH, γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) e l'ergotioneina (ERT, 2-mercaptoistidina trimetilbetaina) sono, rispettivamente, i principali amminotiole e amminotiole intracellulari. Sebbene il ruolo in vivo dell'ERT non sia del tutto noto, diversi studi indicano che possa svolgere un'attività antiossidante al pari del GSH [1]. La misurazione del GSH e dell'ERT può perciò fornire indicazioni sulla salute generale della cellula e sulla sua capacità di opporsi all'azione lesiva di xenobiotici e sostanze radicaliche.

In questo lavoro verrà descritto lo sviluppo di due nuove metodiche mediante elettroforesi capillare zonale (CZE) e cromatografia liquida ad ultra-prestazioni (UPLC) per la misurazione simultanea del GSH e dell'ERT.

L'analisi in CE è stata effettuata utilizzando un capillare di silice fusa (50 µm Ø e 60 cm) e una soluzione di fosfato di sodio tribasico dodecaidrato 5 mM come tampone della corsa. Per la loro quantificazione, i campioni erano derivatizzati con 5-iodoacetamidofluoresceina (5-IAF) e rilevati mediante misura della fluorescenza indotta da laser.

L'analisi in UPLC è stata effettuata utilizzando una colonna a fase inversa (ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6x100 mm, 3.5 µm) e come eluente una miscela di acetonitrile e acido propionico 250 µM pompata in colonna mediante un gradiente lineare della durata di 11 min. Per la loro quantificazione, i campioni erano derivatizzati con 7-Dietilamino-3-[4-(iodoacetamido)fenil]-4-metilcumarina (DCIA) e rilevati mediante misura della fluorescenza alle lunghezze d'onda di eccitazione/emissione 389/467 nm.

La separazione con entrambi i metodi era abbastanza rapida: 2.6min per il GSH e 5.80 min per l'ERT con il metodo in UPLC e 4.0 min per il GSH e 2.80 min per l'ERT con il metodo in CE. A causa della separazione con gradiente, il tempo totale per la separazione in UPLC era di circa 11 min contro i 5min del metodo in CE. La comparazione, mediante il test di Bland-Altman, dei valori ottenuti misurando il GSH e l'ERT negli stessi campioni ha mostrato un buon grado di accordo tra i due metodi. I valori medi misurati per il GSH e l'ERT in un gruppo di 30 volontari apparentemente sani erano, rispettivamente, 800 e 75 µM.

1. Aruoma OI, Spencer JP, Mahmood N, et al. *Food Chem Toxicol* 1999;37:1043-53.

P101

FREQUENZA E TEMPSTICA DI RICONTROLLO DOPO UN PRIMO RISCONTRO DEI VALORI CRITICI DI LABORATORIO

R. Brivio, A. Cappellani, M. Casati, S. Ippolito, V. Minolfi, V. Perlangeli, M.L. Carati

Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. San Gerardo, Monza

Introduzione: I valori critici (VC) di laboratorio rappresentano quei risultati che possono suggerire un pericolo immediato per la vita del paziente qualora non si adottino appropriati interventi. Il Laboratorio Analisi Chimico Cliniche dell'A.O. S. Gerardo di Monza ha da anni instaurato una politica di comunicazione dei VC, mediamente pari allo 0.1% del numero di test eseguiti annualmente. A seguito della comunicazione è spesso difficile per il laboratorio avere un riscontro informativo sull'utilizzo clinico dei VC. Fra gli indicatori indiretti proposti vi sono il numero di VC che si ripresentano dopo il primo riscontro, frequenza ed intervallo temporale di ripetizione; fra quelli diretti l'outcome del paziente¹.

Scopo dello studio: Analizzare per alcuni analiti e per alcuni reparti frequenza di ripetizione ed eventuale rappresentazione, intervallo temporale di ripetizione (IR) e di miglioramento (IM) dei VC comunicati nell'anno 2014.

Materiali e metodi: Sono stati individuati alcuni analiti (pH arterioso, Lattato, Potassio, Sodio, Digossinemia) e 8 reparti di degenza di area medica e chirurgica oltre al Pronto Soccorso, con il numero più elevato di VC. Sono stati calcolati frequenza, IR ed eventuale IM in minuti. Ove disponibili sono stati analizzati i dati di outcome del paziente.

Risultati: Frequenza, intervallo temporale di ripetizione ed eventuale rappresentazione dei VC variano in relazione all'analita e al valore del primo riscontro. Per il pH arterioso dei 129 VC rilevati 76 (59%) sono stati ricontrollati entro un IR di 87 minuti, IM è stato di 163 minuti; 42 pazienti con test non ripetuti o non normalizzati sono deceduti. Lattato: 185 VC, 133 (72%) ricontrollati; IR di 630 e IM di 1000; 28 pazienti con test non ripetuti o normalizzati sono deceduti. Potassio: 670 VC, 586 (87%) ricontrollati, IR di 973 e IM di 1408. Sodio: 120 VC, 91 (75%) ricontrollati, IR di 695 e IM di 4095. Digossinemia: 25 VC, 20 (80%) ricontrollati IR di 1592 e IM di 3852.

Conclusioni: L'analisi della frequenza e tempistica di ripetizione può fornire un contributo al miglioramento della politica di gestione dei VC.

1. Yang D, Zhou Y, Yang C. Analysis of laboratory repeat critical values at a large tertiary teaching hospital in China. PLoS One 2013;8:e59518. 1-7.

P102

VALUTAZIONE DELLE INTERAZIONI NON COVALENTI TRA ALBUMINA E CATECHINE DEI TÈ VERDE MENDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE AD AFFINITÀ

S. Assaretti, D. Arru, D. Cambedda, E. Sotgiu, R. Giordo, A.M. Posadino, A. Cossu, G. Pintus, C. Carru, A. Zinellu

Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari - Servizio Controllo di Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari (AOUSS)

Le catechine sono composti polifenolici presenti ad alte concentrazioni in diverse piante (es. tè verde), che hanno mostrato proprietà anti-infiammatoria e antiossidante. In merito a ciò sono stati sollevati dubbi relativi alla dose biologicamente attiva, che in vitro risulta notevolmente superiore rispetto a quelle riscontrate in vivo. Queste apparenti contraddizioni potrebbero essere spiegate dall'interazione con l'albumina sierica. L'elettroforesi capillare d'affinità (ACE) potrebbe essere un metodo per valutare le costanti di legame tra BSA o HSA e catechine [1]. Sono stati valutati i tempi di migrazione di ogni analita in 5 diversi tamponi contenenti concentrazioni crescenti di albumina (0-4 $\mu\text{mol/L}$). Per caratterizzare l'interazione tra 4 catechine (CE, ECG, EGC, EGCG) e l'albumina bovina (BSA) e umana (HSA) in condizioni fisiologiche è stata impiegata l'elettroforesi capillare ACE: Buffer fosfato 10 mmol/L con HEPES 50 mmol/L (pH 7.5) a 37°C. L'analisi è stata eseguita con capillari in silice fusa rivestiti, lunghi 40 cm e con 75 μm di \varnothing , valutando l'assorbanza a 214 nm. Per calcolare la mobilità degli analiti è stato valutato il rapporto $R = \mu_{\text{eof}} / \mu_{\text{analite}}$, (eof=mobilità elettrosmotica, misurata utilizzando la timidina come marker del EOF). I nostri dati hanno anche confermato che le catechine con il gruppo gallato hanno un'affinità di legame maggiore verso l'albumina (ECG- $3.37 \pm 0.48 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la BSA e $10.3 \pm 0.83 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la HSA; EGCG - $3.68 \pm 0.39 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la BSA - $11.0 \pm 1.06 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la HSA) rispetto alle catechine che ne sono prive (CE- $0.47 \pm 0.08 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la BSA - $1.64 \pm 0.26 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la HSA; EGC- $0.64 \pm 0.10 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la BSA - $2.15 \pm 0.12 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ per la HSA). In accordo con i dati ottenuti in letteratura con altre metodiche le costanti di legame ottenute sono comprese tra $0,45 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ e $11 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, con una maggiore affinità delle catechine verso HSA rispetto alla BSA (tra 3 e 3,5 volte superiore). Per entrambe le albumine l'ordine di affinità è CE << EGC << ECG << EGCG.

1. Trnkova L, et al. Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. J Mol Struct 2011;985:243-50.

P103

INFLUENCE OF SALINE CONTAMINATION ON ROUTINE HEMATOLOGICAL TESTING: AN EXPERIMENTAL STUDY

R. Buonocore, A. Picanza, D. Gennari, F. Sandei, S. Pipitone, G. Lippi

Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, University Hospital of Parma

Background: Although the complete blood count (CBC) represents one of the most important test for investigating hematological diseases, several preanalytical variables may impair its reliability. Collection of diagnostic samples from intravenous route is commonplace in healthcare, and the potential contamination of blood with intravenous fluids, especially saline and glucose solutions, may generate a bias in test results. Therefore, this study was aimed to assess the influence of saline contamination on routine hematological testing.

Methods: The study population included 12 healthy laboratory volunteers (7 women and 5 men; age 27-58 years). Three venous samples were drawn from each subject in primary evacuated blood tubes containing K2EDTA. The autologous blood was pooled and then divided in four aliquots of 2.0 mL each (aliquots [a]; [b]; [c]; [d]). Aliquot [a] was left untreated, whereas a concentration of 5%, 10% and 20% of standard 0.9% saline solution was added to each aliquot [b], [c] and [d], to obtain a scalar degree of contamination. Hematological testing was then completed using a Sysmex XE-2100 (Dasit SpA, Cornaredo, Italy).

Results: As predictable, the leukocyte (-3%, -7%, -15%), erythrocyte (-5%, -10%, -17%) and platelet (-4%, -7%, -15%) counts, as well as the values of hematocrit (-5%, -9%, -17%) and hemoglobin (-5%, -9%, -17%), decreased in parallel with saline contamination, but the overall variation was different (usually lower) than that expected by simple data adjustment for sample dilution. The values of MCV (+0.2%, +0.3%, +0.5%), MCH (+0.3%, +0.2%, -0.3%) and RDW (-0.3%, -0.2%, -0.2%) remained mostly unchanged. The bias was found to be linear for leukocytes, erythrocytes, platelets, hematocrit, hemoglobin and MCV, whereas it deviated substantially from linearity for both MCH and RDW.

Conclusions: Blood samples contamination with standard saline solution causes a meaningful bias in CBC, with a trend that was found to be virtually unpredictable. This is clearly attributable to the shift of water within blood cells, which ultimately impair data correction for the theoretical variation. We hence conclude that whenever blood sample contamination with saline is suspected, the results of CBC should be suppressed.

P104

PERFORMANCE OF THE ARCHITECT ENZYMATIC ASSAY FOR HbA_{1c}D. Szoke¹, A. Carnevale¹, S. Pasqualetti¹, F. Braga², R. Paleari², M. Panteghini^{1,2}¹*Clinical Pathology Unit, "Luigi Sacco" University Hospital, Milano*²*Centre for Metrological Traceability in Laboratory Medicine (CIRME), University of Milan, Milano*

We recently introduced in our laboratory the direct enzymatic method for HbA_{1c} on the Abbott Architect c4000 platform. Its principle is based on the enzymatic quantification of fructosyl dipeptides deriving from the β chains of HbA_{1c} by a fructosylpeptide oxidase. Here we provide data about its analytical performance by reporting our experience in the first 6-month period of work, with emphasis on the accuracy of measurement and its quality when compared to established analytical goals. Assay imprecision was obtained from daily measurements of aliquots of a pool of human EDTA blood samples stored at -20°C, with a HbA_{1c} concentration around the diagnostic cutoff for diabetes. Regular participation to a regional EQAS provided information on the assay accuracy and the participation to a pilot national EQAS, organized by SIBioC, with materials value-assigned by the IFCC HPLC-capillary electrophoresis (CE) reference procedure performed in our reference laboratory, provided information on the alignment of Architect enzymatic assay to higher-order metrological references. The monthly CV was between 0.6% and 1.9% and the cumulative CV (n=122) was 1.1% (mean HbA_{1c} concentration, 47.8 mmol/mol). During the evaluation period 5 exercises of the regional EQAS were carried out. Target values (49.3 - 82.6 mmol/mol) were calculated as the mean of all method results after outliers exclusion (n=311). A mean total error (TE) of -0.22% (range: -3.90% to 1.84%) was obtained. The evaluation of assay traceability was obtained by analyzing two fresh EDTA blood samples with target HbA_{1c} values [± expanded uncertainty (U)] assigned by the IFCC HPLC-CE reference procedure [level 1, 37.4 (±0.57) mmol/mol; level 2, 62.0 (±0.91) mmol/mol]. For both levels, our results (37 and 63 mmol/mol) were within the range of U of the IFCC true value, indicating no bias and negligible TE (-1.1% and 1.6% vs. an allowable maximum TE of ±6%). In conclusion, the full automation of the method, including on-board red blood cell lysis, provides low imprecision that significantly contributes to reduce the measurement uncertainty. On the other hand, the alignment of the analytical system to the IFCC reference measurement system is quite perfect, resulting in virtually unbiased HbA_{1c} results on patient samples.

P105

IL CRITERIO DI ACCETTABILITÀ DEL BIAS ASSOCIATO AL CALBRATORE DEL METODO ENZIMATICO ABBOTT PER LA CREATININA È TROPPO AMPIO E RENDE IL METODO INACCURATO

S. Pasqualetti¹, A. Carnevale¹, I. Infusino², D. Szoke¹, M. Panteghini²

¹UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera 'Luigi Sacco', Milano

²UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera 'Luigi Sacco', Milano e Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

Nel nostro laboratorio per la determinazione della creatinemia è utilizzato il metodo enzimatico Abbott su analizzatore Architect c16000 (cod. 8L24). Il calibratore [Multigent Clin Chem CAL (cod. 6K30) (valore nominale: 4,00 mg/dL, incertezza espansa (U): 1,48%)] è riferibile al materiale NIST SRM967a. Con l'introduzione di un nuovo lotto di CAL [40043Y600 (CAL1)], abbiamo rilevato una costante sovrastima nei risultati della VEQ, che in 6 esercizi eseguiti tra 09.2014 e 02.2015 risultava compresa tra +5,5% e +10,3% (media +8,1%; errore totale accettabile ±8,9%). Visto che l'imprecisione del metodo non poneva problemi (CV totale nei 6 mesi su 2 strumenti, 0,8%), abbiamo verificato l'inesattezza del metodo mediante analisi del SRM967a, affiancando al CAL1 un secondo CAL [lotto 40496Y600 (CAL2)] nel frattempo disponibile. In 2 settimane distinte, sono state effettuate le misure in triplicato per 4 giorni consecutivi dei 2 livelli del SRM967a (valori certificati: L1 0,847 mg/dL e L2 3,877 mg/dL, U=2,11%), calibrando 2 sistemi c16000 alternativamente con CAL1 e CAL2, utilizzando sempre lo stesso lotto di reagente e verificando prima di ogni serie analitica l'allineamento strumentale secondo le specifiche del produttore. La media delle medie (M) delle misure replicate dei 2 livelli del SRM967a ottenute con CAL1 (L1 0,873 mg/dL e L2 4,166 mg/dL) dimostrava un bias positivo, soprattutto alla concentrazione L2 (+3,0% e +7,5%). Viceversa, calibrando i 2 sistemi analitici con CAL2, le M (L1 0,812 mg/dL e L2 3,801 mg/dL) mostravano un bias negativo, di entità minore e prevalentemente a carico della concentrazione L1 (-4,2% e -2,0%). Il produttore dichiara che nel processo di assegnazione dei valori ai CAL la specifica di accettabilità è ±5% del valore target del SRM967a L1, più di 2 volte la sua U certificata. I risultati evidenziano 2 problemi: a) il criterio Abbott di validazione dei valori dei CAL appare troppo ampio, addirittura superiore al bias accettabile nella misura dei campioni (±4,0%); b) essendo il valore nominale del CAL vicino a quello del SRM967a L2 non si capisce perché per la validazione dei CAL venga invece usato L1, aumentando il rischio di disallineare il sistema al riferimento metrologico e causare un errore sistematico nella misura inaccettabile.

P106

VERIFICA DELLA RIFERIBILITÀ METROLOGICA DEI METODI AUTOMATIZZATI PER LA MISURA DELLA PROTEINA 4 DELL'EPIDIDIMO UMANO (HE4) NEL SIERO

S. Borille, A. Carnevale, S. Ferraro, M. Panteghini

UOC Patologia Clinica, AO "Luigi Sacco", e Centro per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università di Milano

HE4 è un nuovo marcatore di cancro dell'ovaio. Sono in commercio 3 metodi di dosaggio, di cui 2 automatizzati, che i produttori dichiarano calibrare verso il metodo manuale EIA Fujiebio. Scopo dello studio era verificare questa dichiarazione. HE4 è stato determinato con metodo ECLIA su Modular E170 Roche, con metodo CMIA su Architect i2000 Abbott e con EIA. I metodi automatizzati hanno un intervallo di misura 15-1500 pmol/L, mentre EIA 15-900 pmol/L. ECLIA differisce da EIA e CMIA per l'anticorpo di rilevazione, mentre l'anticorpo di cattura è comune ai 3 metodi. 116 sieri sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino alla determinazione. I dosaggi in automazione sono stati effettuati in una singola seduta e i campioni misurati in doppio, mentre con EIA ogni campione è stato replicato su 2 piastre nello stesso giorno per un totale di 4 misure. Le relazioni tra metodi automatizzati ed EIA, considerato come riferimento, sono state valutate mediante modello di Passing-Bablok e con il metodo di Bland-Altman è stato valutato il bias, confrontandolo con l'obiettivo desiderabile (±4.7%). Le concentrazioni medie di HE4 nei campioni risultavano 149.5 pmol/L per ECLIA, 156.1 pmol/L per CMIA e 158.9 pmol/L per EIA. I CV medi dei duplicati erano 1.1% per ECLIA, 2.0% per CMIA e 5.3% per EIA. Erano ottenute le seguenti equazioni di regressione: CMIA=1.01(IC: 0.98-1.03)EIA - 5.0(IC: -8.0/-2.1), r=0.993, e ECLIA=0.92(IC: 0.89-0.94)EIA + 5.4(IC: 2.5-8.0), r=0.994. Il bias medio tra CMIA ed EIA era -3.2% (IC: -6.0/-0.5) e tra ECLIA ed EIA -0.2% (IC: -2.9/2.5). Tuttavia, mentre per CMIA il bias si manteneva costante per tutto l'intervallo di misura, per ECLIA lo scatter aumentava per valori EIA <100 pmol/L (fino a +70%) e >250 pmol/L (fino a -28%). L'allineamento dei 2 metodi automatizzati all'EIA risultava molto buono, con bias medio entro l'obiettivo desiderabile. Per ECLIA la scelta di un diverso anticorpo secondario, che lega un dominio diverso della molecola, per ottenere minore ingombro sterico e aumentare affinità e sensibilità analitiche, potrebbe spiegare la tendenziale sovrastima nell'intervallo di concentrazioni fisiologiche di HE4, mentre la sovrastima a valori fortemente patologici potrebbe essere attribuita a una diversa selettività del sandwich anticorpale.

P107

ARMONIZZAZIONE DELLA MISURA DELL'ALBUMINA SIERICA: QUALI INFORMAZIONI DAL PROGRAMMA DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ (VEQ) DEL CENTRO DI RICERCA BIOMEDICA

S. Secchiero, L. Sciacovelli, M. Plebani

Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, U.O.C. Medicina di laboratorio Azienda Ospedaliera-Università di Padova

Introduzione: Le indicazioni "evidence-based" attualmente disponibili supportano l'importanza della misura dell'albumina sierica nella valutazione prognostica di diverse malattie. Il sistema di riferimento è ben definito e tutti i sistemi diagnostici commerciali dichiarano una riferibilità al materiale di riferimento BCR-470.

Scopo: Analizzare il grado di armonizzazione dei risultati, unità di misura ed Intervalli di Riferimento (IR) dei Partecipanti al Programma di VEQ.

Metodi: Per valutare la variabilità interlaboratorio (CV%) sono stati analizzati i risultati di 190 laboratori relativi ai 60 campioni di controllo degli ultimi 6 cicli di VEQ.

Per valutare le differenze tra sistemi diagnostici sono stati analizzati i risultati di 20 campioni (cicli 2013 e 2014). Per ciascuno è stato calcolato il bias% per metodo utilizzando come valore di confronto la media delle mediane di ciascun metodo.

Per valutare le performance dei laboratori sono stati considerati i risultati degli ultimi due cicli di VEQ con un limite di accettabilità <6,11%.

Risultati: Metodi utilizzati dai lab. = 75% colorimetrici, 24% immunometrici. Unità = 64,8% g/dL; 25,3% g/L; 9,9% mg/dL. IR = 22 IR diversi per 92 laboratori. 35-50 g/L e 35-52 g/L quelli maggiormente adottati (20,6% dei lab.)

Prestazioni analitiche nell'intervallo di concentrazione 19-59 g/L = 86,4% accettabili, 13,6% non accettabili (19,7% per conc. 19-28,7g/L).

CV% medio (media dei CV% di ciascun metodo) = 4,03. Solo i sistemi diagnostici con metodi colorimetrici soddisfano il goal analitico minimo per l'imprecisione (<2,4%).

Differenze tra metodi: tutti presentano in più campioni uno scostamento dal valore di consenso superiore all'obiettivo minimo di inesattezza (<2,15%); per i sistemi nefelometrici il bias% è di senso contrario (neg. per Beckman Immage e pos. per Siemens BN); il sistema Roche cobas (turbidimetria) presenta un bias% medio di -7,89±2,34 nel 2013, ridotto a -1,00±2,08 nel 2014.

Discussione e conclusioni: a fronte dell'importanza di questo parametro come test di laboratorio e dell'impegno della comunità scientifica per standardizzare la sua misura, le informazioni ricavate dal programma VEQ del CRB evidenziano una scarsa armonizzazione, sia tra i risultati sia nelle modalità di refertazione dell'albumina sierica.

P108

LABORATORY ACCREDITATION MANAGEMENT: VERIFICATION OF REPEATABILITY AND WITHIN-LABORATORY PRECISION CLAIMS OF TINA-QUANT HbA1c ON COBAS c501

G. Lima-Oliveira¹, G.L. Salvagno¹, L. Giuseppe², G. Brocco¹, B. Barana¹, G.C. Guidi¹

¹Lab. of Clinical Biochemistry, Dep. of Life and Reproduction Sciences, University of Verona, Verona

²Lab. of Clinical Chemistry and Hematology, Academic Hospital of Parma, Parma

Background: Accreditation (i.e., by ISO 15189:2012 standard) is a process aimed to provide independent appraisal and recognition, by one expert medical laboratory professional, of specific competence of testing. According to the ISO 15189 standard, laboratory quality managers should: i) select analyzers and reagents, which have been validated by the producer for their intended use and prefer procedures specified in the IVD instructions for use (i.e., datasheet); and ii) verify performance characteristics declared by the producer, to confirm the datasheet information before it is introduced into routine use. This study was aimed to verify repeatability, and within-laboratory imprecision (performance) claims of Tina-quant HbA1c Gen. 3 on cobas c501.

Material and Methods: The protocol from CLSI EP15-A3 document was used to verify precision claims of Tina-quant HbA1c Gen. 3 on cobas c501 (Roche Diagnostics) using patient samples, and proprietary internal quality control (PreciControl HbA1c path). Briefly, EP15-A3 protocols for precision verification involve repeated measurement of samples over five working days – two samples, one run per day, five replicates per run, for five days, for a total of 25 replicates per sample. Our estimated repeatability and within-laboratory imprecision were compared to manufacturer's repeatability claim (i.e., CV 1.6% and 1.1% for patient sample and PreciControl HbA1c path, respectively), and within-laboratory precision claim (i.e., CV 2.0%, and 1.5% for patient sample and PreciControl HbA1c path, respectively).

Results and Conclusion: Our estimated repeatability displayed 1.4% and 1.0% CV for patient sample and PreciControl HbA1c path, respectively. Our within-laboratory imprecision displayed 1.1% and 1.8% CV for patient sample and PreciControl HbA1c path, respectively. Since both repeatability and within-laboratory imprecision estimate were less than the manufacturer's claims, Tina-quant HbA1c Gen. 3 could be introduced for routine use on cobas c501. Moreover, measuring HbA1c on a robust analytical platform (i.e., cobas c501 connected to a pre-analytical automation system) could reduce both turnaround time and need of human resources.

Reference: ISO 15189:2012, Medical laboratories - Requirements for quality and competence ISO document 15189. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

P109

LA FORMAZIONE SUL CAMPO (FSC) PER STANDARDIZZARE, ARMONIZZARE E COSTRUIRE UN TEAM MULTIDISCIPLINARE E MULTIPROFESSIONALE E RIDISEGNARE LA MEDICINA DI LABORATORIO

M.R. Cavallo¹, C. Vella¹, P. Esposito², R. Sacco³, V. Granero¹

¹S.C. Lab. Analisi, Ospedale Pinerolo, ASL TO3

²S.C. Ricerca Formazione, Ospedale Pinerolo, ASL TO3

³S.C. Direzione Sanitaria, Ospedale Pinerolo, ASL TO3

Scopo: La FSC è un potente strumento innovativo per i professionisti che, attraverso il team building (TB), permette di acquisire competenze armonizzando tempi, risorse e discipline diverse.

Il processo di formazione è indispensabile per la crescita del team e permette al singolo di passare da uno stato ontico ad uno ontotico integrandosi nel processo di cambiamento sociale, culturale e professionale. Le nostre esperienze sono state progettate con un obiettivo a lungo termine, esplicitato e condiviso con la Direzione Sanitaria, e uno in modulazione continua, secondo i feed-back dei partecipanti sul clima di apprendimento. Le conoscenze, competenze ed esperienze dei partecipanti, sono state da ognuno destrutturate e rielaborate secondo il proprio concetto di sé, l'utilità e l'immediata applicazione in nuove conoscenze e competenze integrate con la scoperta per noi di un nuovo modello di essere laboratorio (LAB) e per gli altri di vederci come LAB.

Metodologia: Attraverso il metodo della scelta pesata si è individuato il tema rispetto al quale integrare conoscenze e competenze: l'appropriatezza (prestazioni/100abitanti) e la qualità del dato di LAB.

Il percorso formativo è stato progettato per raggiungere i seguenti obiettivi:

- A breve-medio termine: revisione dei processi evidenziandone opportunità di integrazione e miglioramento a partire dalle fonti EBM.
- A lungo termine: consapevolezza che essere parte di un team permette risultati migliori.

Metodologie: lavoro di gruppo e individuale, plenarie, briefing e debriefing.

Conclusioni:

Abbiamo realizzato 2 FSC:

- La prima con la partecipazione di 142 medici di medicina generale (durata 2 anni) con il risultato raggiunto di passare da una media di 11.7 prestazioni/100 abitanti a 8.9

- La seconda di 1 anno riguarda l'accuratezza del dato di LAB a fini clinici (tuttora in corso) ed attraverso il miglioramento delle performance di controllo ci ha permesso di rivalutare il ruolo della medicina di LAB.

Attraverso il processo di rielaborazione delle conoscenze e competenze e riflettendo sul proprio "modus operandi" si genera un cambiamento stabile ed un miglioramento effettivo di conoscenze e competenze tecniche-relazionali.

Knowles M, et al. Quando l'adulto impara. Franco Angeli, 2008.

P110

ANALYTICAL VARIABILITY IN THE ANTI-HCV TESTING: EVALUATION AND INTERPRETATION OF LABORATORY DATA RESULTS IN SAN GAVINO HOSPITAL

F.B. Ronchi, G. Serra, S. Caria, G. Demuro

Clinical Pathology Service, Osp. San Gavino M.Ie, ASL Sanluri (CA), Italy

Background: Knowing a method's analytical variability (Va) helps the clinician relying on data to better interpret results. Va is a laboratory-specific parameter, usually evaluated in case of quantitative results analysis. Aim of our study is to assess the Va for the qualitative anti-HCV immunoassay in order to quantify the grey zone (close to the cut-off), thus reporting reliable certain positive and certain negative results for patient samples. Material and methods: Intra-assay anti-HCV: Abbott quality controls (QC) positive (pos) and negative (neg), Bio-Rad QC (pos, neg and near cut-off) and a patient sample (S1, close to the cut-off value). The grey zone data (close to the cut-off) were further evaluated by testing 20 patient samples (S20) with near cut-off values (ranged 0.7 - 1.4 S/CO, cut-off = 1.0). Inter-assay: 10 days routine analysis of Abbott (pos, neg), Bio-Rad (pos, neg and near cut-off) quality controls and sample S1. QC data monitored during one year (QCA) by an inter-laboratory quality control program (Unity Real Time, Bio-Rad Laboratories). All tests were performed on Abbott Architect i2000 system with chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). Results: Va values as showed below. Intra-assay (CV %): Abbott pos (4,84); Bio-Rad pos (4,82); Bio-Rad cut-off (4,16); S1 (4,45); S20 (<6,34). Inter-assay (CV %): Abbott pos (5,54); Bio-Rad pos (4,23); Bio-Rad cut-off (6,42); S1 (6,34). QCA during 1 year: CV <6,35 %. QC negative (Abbott and Bio-Rad) Va values were not meaningful (data below the method limit). The accordance of intra-, inter-assay and QCA results witnesses good analytical performances of the system plus its stability throughout time and various S/CO values. Conclusions: The CV values accordance allowed us to estimate the maximum value for Va (CV %: 6,42) thus defining the grey zone (close to the cut off) of anti-HCV immunoassay. In our laboratory patient samples with values above the grey zone will be reported as certain positive, while values below grey zone will be reported as negative. According to our experience we suggest that each laboratory should define its ranges on the base of their analytical imprecision QC values, to assure a correct evaluation of the analytical anti-HCV data

P111

ANALYTICAL PERFORMANCES EVALUATION IN VIROLOGY TESTING: THE QUALITY CONTROL (QC) SYSTEM ADOPTED IN SAN GAVINO HOSPITAL

S. Caria, G. Serra, G. Demuro, F.B. Ronchi

Clinical Pathology Service, Osp. San Gavino M.le, ASL Sanluri (CA), Italy

Background: An efficient QC program requires adopting evaluated decisional limits for the QC results aimed to monitor the system stability and to guarantee precision and quality of the results. Allowable Total Error (Tea) and Westgard Rules guide QC results interpretation in Clinical Chemistry, not in virology testing. Usually virology test imprecision is monitored throughout Levey-Jennings charts with wide ranges of acceptability and by using QC materials that rarely have values close to the cut-off (CO). Object of this study is to evaluate Anti-HCV qualitative testing performances by monitoring the imprecision of various QC materials, including those values close to the CO. Methods: Analytical imprecision (CVa) of Anti-HCV test (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA) has been evaluated throughout intra- (CVr) and inter-assay (CVd) analyses performed in 10 days with Abbott Architect i2000. Sample patients: Negative (Neg), Positive (Pos) and 21 patients whose values ranged 0.7–1.4 S/CO. Abbott in-kit QCs (Neg, Pos). Bio-Rad independent QCs (Neg, Pos, close to CO). Method's CO is 1.0 S/CO. All data managed with Bio-Rad Unity™ Real Time program adopted in our Laboratory for Bio-Rad QC evaluation through intra- and inter-laboratory comparison (ILC). Results: CVa values for Neg samples not recorded (S/CO data below the method limit). CVa values Pos (CV%): QC Abbott 4,84 (CVr), 5,54 (CVd); QC Bio-Rad 4,82 (CVr), 4,23 (CVd); patient sample: 5,48 (CVr). CVa values close to CO (CV%): QC Bio-Rad 4,16 (CVr), 6,42 (CVd); 21 Patient samples: 4,45 (CVr), 6,34 (CVd). No Abbott QCs materials close to CO available. Bio-Rad Pos QC: CV (ILC) < 6,35 % (1 year results). Conclusions: Our CVs showed good performances of the analytical system. Bio-Rad independent QC material gave sensible warnings about method's variability at various concentrations (S/CO), even close to clinical decision limits. Great accordance of intra-, inter-series and Bio-Rad (ILC) CV% values, ensures both good performances in terms of CVa and the effectiveness of a QC system built on independent control material and daily evaluation of QC data through dedicated software data collection. Our work underlines the importance of adopting an independent QC system to evaluate CVa for tests reported as S/CO.

P112

DETERMINAZIONE DELL'EMOGLOBINA GLICATA: VALUTAZIONE DELLO STRUMENTO Hb9210 PREMIERL. Brugnolo¹, A. Casarotti¹, C. Artusi¹, M. Marinova¹, G. Antonelli², M. Zaninotto¹, M. Plebani¹¹*U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova*²*Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova*

Introduzione: Il principio analitico di riferimento per l'emoglobina glicata (HbA1c) è la cromatografia di affinità al boronato che permette la separazione della frazione glicata dalla non-glicata. Lo strumento Premier Hb9210™ (A. Menarini Diagnostic) utilizza questo principio per rilevare tutte le specie di HbA1c presenti; sul cromatogramma sono presenti due picchi: uno riferito alla frazione glicata e uno alla non glicata (tutti gli altri tipi di emoglobina).

Obiettivi: Valutare le prestazioni analitiche dello strumento nella determinazione di HbA1c e confrontare i risultati ottenuti su campioni che presentano e che non presentano varianti emoglobine con quelli ottenuti sullo strumento Adams HA8160 V (A. Menarini Diagnostics) utilizzato in routine.

Materiali e metodi: Precisione: valutata secondo il protocollo CLSI-EP5A2 utilizzando 4 pool di sangue intero a diverse concentrazioni di HbA1c (30-40-48-75 mmol/mol); accuratezza: verificata utilizzando i risultati di 8 campioni pervenuti per VEQ esterna; confronto tra i due sistemi: eseguito su 180 campioni che non presentano varianti emoglobiniche e su 50 campioni con diversi tipi di varianti emoglobiniche (HbS=19, HbD Punjab=9, HbHasharon=8, HbC=4, HbE=4, HbG=3, HbJ=1). I due strumenti sono stati messi a confronto attraverso la regressione lineare e l'analisi di Bland-Altman (Analyse-it® Software Ltd, UK).

Risultati: Imprecisione (CV%, n=80) è <3.7%, bias è <6.0%. Il gruppo di pazienti privi di varianti emoglobiniche, presenta un'ottima correlazione (R2=0.99, p<0.0001) e un bias di 0.8 mmol/mol (0.4-1.1, 95%CI), statisticamente ma non clinicamente significativo. La scarsa numerosità del gruppo di pazienti con emoglobinopatie non consente di ottenere dati statistici affidabili, ma si può affermare che non ci sono differenze >5mmol/mol che corrispondono a un cambiamento significativo nel controllo glicemico.

Conclusioni: La misura di HbA1c effettuata con il sistema in valutazione risultata veloce, precisa, accurata e non risente dell'eventuale interferenza delle più frequenti varianti emoglobiniche; infatti il metodo basato sulla cromatografia di affinità al boronato non ne consente l'individuazione, caratteristica che lo differenzia in maniera significativa dai metodi separativi più diffusi nella pratica routinaria.

P113

AREA LOW: ANOTHER MOSAIC TILE FOR HbA1C VALIDATION WITH TOSOH G8

D. Scribano, L. Colacicco, M. Teti, R. Rizza, C. Zuppi, T. De Michele

Dipartimento di Medicina e Diagnostica di Laboratorio, Pol. A. Gemelli, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma

Background: It is mandatory the correctness of glycosylated hemoglobin (HbA1C) (NGSP-IFCC standardized) values, being the gold standard for the assessment of glycemic control in diabetic patients and a valuable tool for the screening and diagnosis of diabetes. We improved the validation of HbA1C putting new alert flags in the software of our instrument Tosoh, blocking the on-line storage of flagged data. So after visual chromatogram inspection, we report these results with suitable comments.

Aim of study: Our attention was concentrated on area low alert flag (<700) of HbA1C, often associated to various anaemic conditions, for suspected underevaluation of HbA1C levels, with simultaneous examination of blood count cells.

Materials and Methods: We analysed 51 routine samples: 30 females (y.o. 40-85) and 21 males (y.o. 14-82) with low area flag. Instrument: Glycohemoglobin Analyser Tosoh automated HLC-723-G8 (TosohBioscience)IFCC-NGSP standardized, interfaced with the LIS DALI GESI LTD. The accuracy was secured by the daily CQI on 2 levels, with imprecision values less than 2% (CV<2%).

Results: We plotted HbA1c values with the haematological data: total hemoglobin (THb), haematocrit (HcT) and medium cell blood volume (MCV). The statistical simple regression analysis showed significant correlation between area low and THb ($R=0.40$, $p<0.003$), area low and HcT ($R=0.35$, $p<0.01$), without sex difference; the multiple regression analysis pointed out a significant statistical correlation between HbA1C and THb ($r^2=21$, $SE=40.6$, $p<0.005$)

Discussion: In these study we observed reduced HbA1C values for altered red-cell lifespan, with poor correlation with average of glycemic levels. Since there are several factors which can influence HbA1C results as analytical (hemoglobinopathies, HbF increased), demographic, or clinical (decreased red cell survival, smoking, iron deficiency, vitamin use, decreased/increased glycation of hemoglobin due to phenotype and biological variation) it is essential requirement a close validation of HbA1C values compared to possible patient pathologies and in our cases, where red-cell lifespan is altered, alternative means of measuring glycemic control using non hemoglobin based methods such as glycosylated albumin or fructosamines may need to be considered.

P114

EMOGLOBINA GLICATA E TRAIT BETA TALASSEMICO

L. Forner, M.G. Meneghini, M. Lovato, C. Dalla Valle, M. Carta

Lab. Analisi, Osp. S. Bortolo, Vicenza

Scopo: l'emoglobina glicata (HbA_{1c}) è influenzata dalla vita media eritrocitaria. I pazienti portatori di trait β -talassemico presentano una lieve riduzione dell'emivita eritrocitaria (1) e questo potrebbe avere ripercussioni sui valori di HbA_{1c}. Il trait è frequente ma sono presenti in letteratura solo pochi studi. Abbiamo quindi confrontato i valori di HbA_{1c} in una serie di pazienti con trait β -talassemico con l'HbA_{1c} ottenuta in pazienti di controllo.

Materiali e metodi: sono stati inseriti nello studio 104 pazienti: 52 con trait β -talassemico diagnosticato sulla base dell'assetto emoglobinico (Variant II dual kit Biorad), senza altre patologie intercorrenti e 52 volontari sani non talassemici. Dallo studio sono stati esclusi i pazienti diabetici, bambini, anziani e donne in gravidanza. L'HbA_{1c} è stata dosata con HPLC Variant II turbo Biorad.

Risultati: le popolazioni confrontate sono omogenee per numerosità e per età media. Il test di Mann Whitney non ha mostrato differenze statisticamente significative tra l'HbA_{1c} dosata nei pazienti con trait β -talassemico e l'HbA_{1c} dosata nei controlli (mediana 36 mmol/mol (35-37.53) nei pazienti talassemici e mediana 36 mmol/mol (35-36.53) nei pazienti di controllo con $P=0.27$).

Conclusioni: l'HbA_{1c} è utilizzata nella diagnosi e nello screening del diabete mellito. È necessario quindi valutare le cause che possono influenzare il reale valore. La riduzione dell'emivita eritrocitaria si associa ad una sottostima del valore di HbA_{1c}. Il trait β -talassemico è una condizione eterogena ma tipicamente associata ad una lieve anemia con una diminuzione della produzione delle catene beta dell'emoglobina e una lieve riduzione dell'emivita media eritrocitaria. Abbiamo quindi confrontato i valori di HbA_{1c} ottenuti in una serie di pazienti con trait β -talassemico con l'HbA_{1c} ottenuta in una serie di pazienti di controllo. I dati ottenuti non hanno mostrato differenze significative e quindi la nostra esperienza dimostra che i valori di HbA_{1c} non risultano sottostimati nei pazienti con trait β -talassemico.

1. Gallo E, Pich P, Ricco G, et al. The relationship between anemia, fecal stercobilinogen, erythrocyte survival and globin synthesis in heterozygotes for β thalassemia. Blood 1975;46:693-8.

P115

EVALUATION OF THE D-100 HPLC SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF GLYCATED HEMOGLOBIN

R. Paelari¹, D. Saibene², R. Moia³, M. Besozzi³, M. Varini⁴, M. Pezzo⁴, F. Ceriotti², A. Mosca¹

¹Centro per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano, Milano (MI)

²Laboratorio di Standardizzazione, Servizio Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano (MI)

³Laboratorio di Analisi Cliniche, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano (MI)

⁴Laboratorio Analisi, Ospedale di Suzzara, Suzzara (MN)

Background: The HbA1c testing is set to assume a greater role in the next few years as a consequence of the introduction of HbA1c for the diagnosis in addition to its conventional use for monitoring of diabetic patients, and of the global increasing frequency of diabetes. Accordingly, the methods used for HbA1c determination need to provide excellent performance in terms of analytical quality as well as robustness, usability and throughput. The analytical performances of a new HPLC analyzer, D-100 from Bio-Rad Laboratories, has been evaluated.

Methods: Precision was tested by using the CLSI-EP5 protocol and measured for 20 working days, 2 runs a day, with a duplicate per run, on aliquots of frozen blood samples at four different HbA1c levels (30, 47, 62, and 108 mmol/mol). For method comparison, 40 blood samples with HbA1c values well distributed over the measuring interval, were analyzed in duplicate according to EP9-A2IR. The following comparison methods were used: Menarini HA 8180, Roche Cobas 501, Sebia Capillarys FP2, Tosoh G8. Trueness was evaluated by analyzing two IFCC value-assigned samples. The influence of two common hemoglobin variants (HbS and HbC) was also evaluated.

Results: Total reproducibility was found to be very good at any HbA1c level tested, with CV values always <2 %, well below the recommended goal for imprecision of CV<3%. Method comparison study proved D-100 results were well correlated with those obtained with other methods and provided the following linear regression (least square) equations (D-100 was considered as y, other methods as x), $y=1.000x-1.52$, $R^2=0.995$ (D-100 vs Menarini); $y=1.014x-2.41$, $R^2=0.993$ (D-100 vs Roche); $y=0.953x+0.71$, $R^2=0.997$ (D-100 vs Sebia); $y=0.969x-1.85$, $R^2=0.998$ (D-100 vs Tosoh). With regard to trueness, D-100 presented a bias of -1.4 mmol/mol at HbA1c level of 31.7 mmol/mol and +0.8 mmol/mol at 78.0 mmol/mol respect to the IFCC target values. HbC and HbS were clearly eluted after HbA0 and not integrated for the calculation of HbA1c.

Conclusion: The Bio-Rad D-100 system is a fully automated, user-friendly, high throughput HPLC system giving accurate and well reproducible results, thus displaying the appropriate characteristics to be used as a routine method in clinical laboratories.

P116

EARLY MEASUREMENT OF HBA1C AND GLYCATED ALBUMIN USEFUL FOR THE PREDICTION OF TREATMENT RESPONSE IN TYPE 2 DIABETES

A. Ognibene¹, M. Lorubbio¹, B. Nreu³, J. Samavat², M. Monami⁴, B. Salvadori¹, E. Mannucci³, M. Luconi²

¹General Laboratory, Careggi Hospital, Florence, Italy

²Endocrinology Unit, Dept. Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence, Italy

³Diabetology, Careggi Hospital, Florence, Italy

⁴Geriatric Division, Careggi Hospital, Florence, Italy

Background: Early assessment of the response of type 2 diabetes mellitus (T2DM)-affected patients to the initiated pharmacological treatment is urgently required to improve patient's management and avoid ineffective long-term use of pharmacological therapies. HbA1c, which is strictly correlated with 3-month mean glycemia, is currently considered the gold standard for monitoring chronic glycemia of T2DM patients and usually measured every 3-6 months. Glycated albumin (GA) has been proposed as an indicator of shorter-term (2-week) glucose control, although standardization of measurement methods has not been achieved yet. Aim of the present pilot study was to explore the possibility of predicting 3-month HbA1c variation by measuring HbA1c or GA at 15-30 days.

Methods: 27 metformin-treated patients with T2DM initiating a pharmacological treatment other than insulin were enrolled after written informed consent from January 2014 to April 2014. The patients, aged 64.7 ± 10.1 years, body mass index (BMI) 29.4 ± 6.1 Kg/m², had a duration of diabetes of 8.6 ± 8.3 years. Patients were prescribed a different treatment consisting of higher metformin doses (N=13), DPP-4 inhibitors (N=7), GLP-1 receptor agonists (N=6), or acarbose (N=1). HbA1c and GA were measured at baseline, 15, and 30 days, and at 90 ± 3 days.

Results: HbA1c at 90 days (50.0 ± 7.2 mmol/mol; $6.7 \pm 0.7\%$) was significantly ($p < 0.001$) reduced from baseline (59.0 ± 12.0 mmol/mol; $7.5 \pm 1.1\%$). A significant reduction was already present at 15 days (56.0 ± 7.8 mmol/mol; 7.3 ± 0.7 , $p < 0.01$) and confirmed at 30 days (53.0 ± 7.0 mmol/mol; $7.0 \pm 0.6\%$, $P < 0.001$). A similar pattern was found for GA, which was significantly lower at 15 ($28.8 \pm 10.8\%$, $p=0.03$) and 30 ($27.0 \pm 9.8\%$, $p < 0.001$) days than at baseline ($31.9 \pm 11.3\%$). Variations of both HbA1c and GA at 15 days, and of HbA1c, but not GA, at 30 days, showed a significant correlation with 90-day variation of HbA1c.

Conclusion: This pilot study suggests that variations of HbA1c measured as early as 15 days from the start of treatment can accurately predict 3-months results. This data suggests that variation of HbA1c may represent a better short-time predictor of therapeutic response than GA. In conclusion, an early (15-day) determination of HbA1c can be of help for the assessment of treatment response. This result deserves to be further verified in larger samples.

P117

25(OH)D DEFICIENCY AND METABOLIC CONTROL OF DIABETES: A PROBLEMATIC BALANCE

M. Monari¹, R. Assandri¹, A. Vagnini¹, M. Ciotti¹, A. Montanelli²

¹Humanitas Clinical and Research Center, Clinical Investigation Laboratory, Rozzano, Milan, Italy

²Clinical Investigation Laboratory, Spedali Civili of Brescia, Brescia, Italy

Objectives: Increasing evidence suggests that vitamin D plays a role in the development of chronic diseases including glycosylated hemoglobin (DM). Aim of the study was to explore the association of vitamin D levels with prevalent DM and we will focus our attention on the relationship between the levels of vitamin D and the presence of not compensated type 2 diabetes mellitus in a Northern Italy population.

Methods: This cross-sectional study involved employees of a 307 not compensated diabetic patients and 223 compensated subjects (72% male, mean age 51.9 ±5.6 years). Socio-demographics and medical history were assessed by self-report. Clinical characteristics were obtained including blood samples to determine vitamin D levels and diabetes status by fasting plasma glucose (FPG) and glycosylated hemoglobin (HbA1c). Bivariate associations between vitamin D categories and a composite indicator for DM (FPG ≥126 mg/dl or HbA1c ≥6.5% or self-reported diagnosis) were calculated; multivariable models tested this association further, controlling for potential confounders.

Results: Compared to those in the non-diabetic group, participants with prevalent diabetes showed lower levels of 25(OH)D (20.8 ±10.8 ng/ml vs. 18.8±10.0 ng/ml, p ≤0.05; HbA1c 5.9% ±1.95 vs 8.57% ±3.9). Severe vitamin D deficiency (<10 ng/ml) was associated with increasing FPG (β 3.13; 95%CI: 0.78, 5.47; p ≤0.01) and HbA1c (β 0.15; 95%CI: 0.08, 0.23; p ≤0.001) values in adjusted linear regression models

Conclusions: Vitamin D deficiency is associated with prevalent DM in adults.

The findings highlight that the workplace may be a unique location for conducting large-scale health screening to identify those at risk of DM using vitamin D.

P118

LOW-DOSE ORLISTAT IN OBESE SUBJECTS: NOT ONLY WEIGHT-LOSS

L. Rossi¹, L. Della Bartola², O. Giampietro², M.C. Masoni², G. Pellegrini³, C. Consani², E. Matteucci²

¹Training Area, Direction Technical Professions Health and Rehabilitation, University Hospital of Pisa

²Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa

³Clinical Analysis Laboratory, University Hospital of Pisa

Background and Aims: A hydrogenated derivative of lipstatin (natural product of *Streptomyces toxytricini*), Orlistat, potently inhibits gastric and pancreatic lipases, enzymes that hydrolyze dietary fats to free fatty acids and 2-monoacylglycerides. Thus, the blockade of these enzymes reduces the gastrointestinal absorption of fat (by about 30%) and that of fat-soluble vitamins. Orlistat has been widely employed in obese people in recent years, chiefly for weight-loss. The most employed dosage has been 120 mg three times daily. Since data on metabolic analytes are not homogeneous, frequently inconclusive or not referred, we assessed the safety and efficacy by clinical laboratory evaluations, physical examinations and vital signs.

Materials and methods: We report here results from a three month study at a low-dose dose (60 mg twice daily) in 15 overweight subjects with metabolic syndrome characteristics (hyperglycaemia, dyslipidaemia, hypertension) with no change of diet and physical habits and no other drugs.

Results: We observed a significant decrease of weight (98±13 kg at baseline vs 95±15 at 90 days follow up, p <0.0001), BMI (37±2 vs 36±2, p <0.0001), glucose (115±6 mg/dL vs 103±4, p <0.0001) and glycated haemoglobin (6.0±0.2% vs 5.9±0.2, p <0.002), diastolic pressure (87±8 mmHg vs 80±8, p <0.01), total cholesterol (208±8 mg/dL vs 189±9, p <0.0001), LDL cholesterol (159±17 mg/dL vs 147±12, p <0.001), non-HDL cholesterol (167±11 mg/dL vs 146±11, p <0.0001), triglycerides (159±17 mg/dL vs 147±12, p <0.0001), with a mild significant rise of HDL cholesterol (41±7 mg/dL vs 43±6, p <0.05). Of relevance, the decrease of non-HDL fraction was double of that of LDL (13 vs 7 %) suggesting effectiveness not only on LDL cholesterol, but also on cholesterol carried by VLDL.

Discussion and conclusions: Our data suggest that Orlistat even at low dosages may improve clinical and laboratory parameters in obese subjects. The effectiveness of the drug in patients resistant to dietary measures has not been demonstrated by other authors; must generally be avoided the temptation to use the drug as an alternative to the diet.

P119

RELATIONSHIP BETWEEN THE ESTIMATED AVERAGE GLUCOSE AND AVERAGE GLUCOSE BASE IN PATIENTS WITH NORMAL OR REDUCED EGFR

L. Loiodice, E. Mascolo, L. Nlsi, M. Pasculli, A. Colacicco, T. Calabria, A.M. Rutigliano, G. Ferrara, A. Guastadisegni, A. Di Serio

U.O. Clinical Pathology I, Policlinico of Bari

Introduction: in relation to modifiable variables such as adherence to the diet, increased or weight reduction, after therapeutic actions or during therapeutic changes, with or without physical activity, subjects, glicidi intolerant, diabetic or even healthy, may have broadly unchanged serum fasting blood sugar levels that may not be properly modulated. The introduction of the Estimated average glycemia (eGA in mg/dl) with the dosage of HbA1c (mmol/mol), according to the formula of the ADA and EASD ($28,7 \times \text{HbA1c} - 46,7$), could be useful in predicting situations of failure in report eGFR values and its criticality levels. The eGA is correlated to serum fasting blood glucose average baseline of database laboratory.

Materials and methods: Forty patients were selected (average age: 53 years old; 25 Males and 15 Females) that perform frequent checks of HbA1c (Bio-Rad), with time interval from one year to six months, and repeated doses of serum fasting blood sugar levels (Siemens) to be correlated with the eAG. The subjects were studied in relation to the values eGFR: 20 patients with normal values (>90 ml/min) and twenty with reduced eGFR (between 85 and 12 ml/min). The correlation was conducted in accordance with Pearson and Student's test for paired data

Results: In the group with normal eGFR has been found a statistical significance with $P=0.0079$ at t tests and, in the group with eGFR reduced, the statistically significant difference has a value of $P=0.0001$. The linear correlation is positive in accordance with Pearson correlation coefficient of 0.91 for both. According to the linear regression of Passing & Bablok there are not significant deviations from linearity with $P=0.58$ for normal or reduced eGFR.

Discussion and conclusions: the positive linear correlation between eGA and fasting serum blood glucose, is metabolic complex expression of life of the red cell and should be considered in relation to renal function and cardiovascular risk for a proper diagnostic evaluation.

P120

PRIME VALUTAZIONI SUL DOSAGGIO INDIRETTO DELLA VASOPRESSINA MEDIANTE CT-proAVP

M. Brugia¹, F. Balducci¹, M. Piaggese¹, R. Ferroni¹, G. Arnaldi²

¹Laboratorio Biochimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedali Riuniti, Ancona

²Clinica Endocrinologica, Azienda Ospedali Riuniti, Ancona

Premesse e scopo dello studio: La CT-proAVP, denominata anche copeptina, è un peptide di 39 aminoacidi sintetizzato prevalentemente a livello dell'ipotalamo nei neuroni magno-cellulari ed è la porzione C- terminale di pre-provasopressina dal quale deriva vasopressina (AVP) e copeptina con relazione stechiometrica di 1:1. In questo modo il dosaggio della copeptina è una misura indiretta della vasopressina, che invece è una molecola con emivita breve e difficile da dosare. Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare se la determinazione del CT-proAVP può essere utilizzata come parametro indiretto di valutazione di AVP. Materiali e metodi: I 63 campioni di siero presi in esame in questo studio sono quelli relativi a 46 pazienti ricoverati presso vari reparti dell'azienda Ospedali Riuniti di Ancona. Tutti i campioni sono stati prelevati al mattino a digiuno dopo 8 ore di privazione di liquidi. In tutti i campioni è stato dosato CT-proAVP (CT-proAVP Thermo Scientific BRAHMS Kryptor Compact Plus). I cut-off utilizzati: <2.6 pmol/L diabete insipido centrale completo, $>2.6 -20$ pmol/L prelevare secondo campione, >20 pmol/L diabete insipido nefrogenico.

Risultati e conclusioni: 13 campioni avevano valori di CT-proAVP <2.6 pmol/L (valore medio 1.8 pmol/L), 36 avevano valori compresi tra 2.6 e 20 pmol/L (valore medio 9.7 pmol/L) e 17 valori >20 pmol/L (valore medio 69 pmol/L). Dei 7 pazienti con valori bassi di CT-proAVP 1 aveva diabete insipido, 6 avevano disfunzioni ipofisarie. I 13 pazienti con valori elevati 4 avevano problemi renali, 4 erano stati sottoposti ad interventi di cardiocirurgia e 5 pazienti provenivano dalla medicina con iponatriemia. dei 26 pazienti con valori intermedi 14 avevano valori di sodio nella norma, mentre 12 avevano valori di sodio nel sangue <135 mEq/L rientrati a distanza di 24 ore.

Nella routine clinica la misurazione della vasopressina viene effettuata di rado a causa di difficoltà tecniche e della scarsa affidabilità dei test oggi a disposizione, di conseguenza questo parametro non viene adeguatamente integrato nelle strategie diagnostiche. Oggi la CT-proAVP, surrogato della vasopressina, offre la possibilità di sfruttare il potenziale diagnostico di questo ormone come dimostrato dai nostri dati preliminari.

P121

PLASMA LEVELS OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE IN NORMAL, OVERWEIGHT AND OBESE YOUNG POPULATION

S. Del Ry¹, M. Cabiati¹, V. Bianchi², L. Caponi³, M. Maltinti⁴, C. Caselli¹, B. Marchi², S. Marchetti², E. Randazzo², A. Clerico⁴, G. Federico²

¹CNR Institute of Clinical Physiology, CNR, Italy

²Sezione di Diabetologia Pediatrica, U.O. Pediatria Universitaria, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy

³Dipartimento di ricerca traslazionale e nuove tecnologie in medicina e chirurgia, Università di Pisa, Italy

⁴Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy

Background: Recent evidence suggested C-type NP (CNP) as an important, natural regulator of adipogenesis. Aim of the study was to evaluate plasma levels of CNP in normal (N), overweight (OW) and obese (O) young population.

Methods: CNP plasma levels were measured in 82 subjects (age: 13.0±2.3; BMI-N=20.3±0.5; BMI-OW=25.3±0.5 BMI-O=30.3±0.6) by a specific radioimmunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, c/o Pantec, Italy). NT-proBNP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), MRproANP (KRIPTOR: BRAHMS AG) and biochemical parameters were also measured in the same samples. Advanced glycated endproducts (AGEs) dependent skin autofluorescence was measured by the AGE reader apparatus.

Results: CNP plasma levels resulted progressively reduced in OW=8.8±3.5, n=10 and O=6.7±0.9, n=43 with respect to normal (N=10.4±1.6 pg/mL, n=25; p=0.04 N vs.O) while NT-proBNP (N=36.2±5.9; OW=62.1±30.9 O=54.4±6.4 pg/mL) and MRproANP (N=29.1±1.7; OW=31.8±5.4 O=30.5±1.7 pmol/L) resulted similar in all groups. Insulin (p <0.0001), cholesterol (p=0.003), triglycerides (p=ns) and LDL (p=0.0005) were progressively higher in O and OW in comparison with N subjects. Higher amounts of AGEs were observed in OW (1.74±0.4) and O (1.45±0.06) in comparison with normal (1.28±0.04 AF, p=0.02 N vs. OW). Visceral trunk fat was also measured and resulted significantly higher in OW (36.1±2.39) and O (39.4±0.69) with respect to N (23.3±1.6, p <0.0001 respectively). CNP correlated significantly with age (p=0.001), fat mass (p=0.007), insulin (p=0.01), cholesterol (p <0.0001), LDL (p=0.0006), NT-proBNP (p=0.01) and MRproANP (p=0.01). Circulating CNP values were similar in males and females. A significant correlation (r=0.313, p=0.006) was observed between AGEs and trunk fat.

Conclusion: In the population studied we observed lower plasma CNP levels confirming previous data. The correlations observed suggested that these alterations might be in part due to endocrine-metabolic deregulation. The direct relationship between visceral trunk fat and skin AGEs confirms the increased risk of vascular disease due to accumulation of abdominal fat in our population, while the relationship between skin AGEs and circulating levels of total cholesterol and LDL reflects an incorrect food eating.

P122

ORMONE ANTIMULLERIANO (AMH): UN NUOVO METODO AUTOMATIZZATO IN CHEMILUMINESCENZA

E. Baraldi, M.C. De Santis, L. Roli, T. Trenti

Dip. Interaziendale ad attività integrata di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, NOCSAE, Modena

Scopo: AMH è principalmente utilizzato in ginecologia nella valutazione della riserva ovarica e per predire la risposta a una stimolazione ovarica controllata nelle donne infertili. Dato il sempre più ampio utilizzo di AMH (pediatria, oncologia), è fondamentale poter disporre di risultati accurati e riproducibili, in tempi idonei. Il metodo più diffuso è l'ELISA con intrinseci limiti di sensibilità e produttività; per ovviare abbiamo sperimentato un metodo automatizzato di recente commercializzazione.

Metodologia: Sono stati analizzati 107 campioni di siero di donne di età compresa tra 22 e 52 anni, con problemi di subfertilità e disordini endocrino-riproduttivi: i dosaggi sono stati eseguiti utilizzando il kit manuale AMH Gen II ELISA (BeckmanCoulter) e il kit Access AMH (BeckmanCoulter), immunodosaggio chemiluminescente con particelle paramagnetiche, sullo strumento Unicel DxI 600. Le concentrazioni di AMH dei campioni erano nel range da 0 a 22 ng/ml.

Risultati: L'imprecisione totale dei dosaggi AMH Gen II ELISA e Access AMH è stata rispettivamente ≤12.0 % e ≤10.0%, per concentrazioni da 0.16 a 22 ng/ml. Il limite di sensibilità dei metodi è stato rispettivamente di 0.08 ng/ml e 0.02 ng/ml.

Per i dosaggi AMH Gen II e Access AMH la mediana è stata 1.51 (0.08-20.0) ng/ml e 1.03 (0.02-25.4) ng/ml, rispettivamente (P <0.0001).

L'equazione della regressione Passing-Bablok (in ng/ml) è:

$y(\text{AMH Access}) = -0.0195 + 0.7312x(\text{AMH Gen II ELISA})$ e il coefficiente di regressione $R = 0.988$.

Conclusioni: Il metodo automatizzato Access AMH ha rivelato maggiore riproducibilità, sensibilità e praticabilità rispetto al dosaggio ELISA AMH Gen II; le concentrazioni ottenute sono leggermente inferiori, ma ben correlate.

Questo studio facilita il confronto tra i risultati precedenti e quelli che saranno ottenuti in futuro, utilizzando uno o l'altro dei due metodi, in attesa di una standardizzazione dei dosaggi disponibili.

Non è raccomandato fare una conversione diretta dei cut-off presenti in letteratura, ma è fondamentale una valutazione critica dei valori di AMH in associazione ad altri parametri diagnostici (FSH-E2) ed ecografici, da parte del laboratorista e del clinico.

La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, et al. Anti-Mullerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2011;22:341-9.

P123

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE: RISULTATI STATISTICI DESCRITTIVI DI 5 ANNI DI ATTIVITÀ

M.C. De Santis, L. Roli, D. Nozzi, T. Trenti, E. Baraldi

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

Razionale: I laboratori dell'AUSL Modena eseguono l'analisi del liquido seminale di 1° livello per tutta la Provincia valutando i parametri standard secondo il Manuale WHO 2010. Dati OMS indicano che il 10-20 % delle coppie nei paesi industrializzati soffre di infertilità, nel 40-50% di questi casi è l'uomo ad avere una ridotta capacità riproduttiva. La principale causa è il varicocele (19,2%) seguito da cause endocrine ed andrologiche. L'analisi del liquido seminale rappresenta il primo approccio diagnostico e prognostico all'infertilità.

Scopo dello studio: Analizzare criticamente i dati raccolti negli ultimi 5 anni e individuare eventuali associazioni con fattori socio-ambientali e altri indicatori dello stato di salute. Sono qui presentati i primi risultati descrittivi.

Materiali e metodi: I dati di 4690 campioni analizzati tra settembre 2010 e febbraio 2015 sono stati estratti dal sistema informatico del laboratorio ed elaborati in un database.

Risultati: L'età media era 34,82±8,46. Il 5,4% di età <20 anni, 24,4% tra 21 e 30 anni, 47% tra 31 e 40 anni, 19,7% tra 41 e 50 anni e 3,5% con età >50 anni. Gli azoospermici erano il 4,4% dei pazienti, con età media di 36,26±8,67 anni; il 53,9% di questi casi era associato ad un aspetto acquoso. Il numero medio di spermatozoi era 67,3±73,5 milioni/ml; il 25% dei campioni aveva una concentrazione di spermatozoi inferiore o uguale alla soglia di normalità (15x10⁶/ml e 39x10⁶ totale). La percentuale media di forme tipiche era 8,9% con una mediana di 3,7%. La motilità progressiva era assente nel 4,4% dei casi e i campioni con solo spermatozoi immobili erano l'1,8%; la percentuale media di motilità progressiva era pari al 34,85%; nel 51% dei campioni la motilità progressiva era inferiore alla norma (<32%) e nel 39% dei casi la motilità totale inferiore a 40%

Conclusioni: L'ampia dispersione dei valori attorno alle medie di alcuni parametri suggerisce la necessità di approfondimento attraverso la stratificazione in gruppi omogenei. Questi primi risultati indicano comunque che circa il 30% dei campioni era oligo e azoospermico e il 39% era astenozoospermico. Lo spermogramma di primo livello si conferma quindi un valido e semplice strumento per l'individuazione precoce di patologie a carattere ingravescente nel tempo.

WHO laboratory manual, 5th ed, 2010.

P124

LIMITATIONS OF LATE NIGHT SALIVARY CORTISOL BY AUTOMATED ASSAY IN THE DIAGNOSIS OF PSEUDO-CUSHING'S STATESM. Brugia¹, F. Balducci¹, M. Piaggese¹, G. Marcelli², C. Concettoni², L. Trementino², G. Michetti², G. Arnaldi²¹Lab. di Biochimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedali Riuniti Ancona²Clinica di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Azienda Ospedali Riuniti Ancona

Context: Late-night salivary cortisol (LNSC) measurement has been promoted as screening test for the diagnosis of Cushing's Syndrome (CS). However, normal reference ranges and diagnostic cutoff should be validated in each laboratory before being applied in clinical practice. In addition, only few studies have compared prospectively different screening tests for hypercortisolism within the same population and in patients with Pseudo-Cushing states (PC).

Aim: To prospectively evaluate the usefulness of LNSC measured by automated assay as chemiluminescence (ECLIA) in a wide cohort of ambulatory patients with suspect of hypercortisolism and compare the results with other tests current used to diagnose CS (suppression test DST; urinary free cortisol UFC; MSC midnight serum cortisol).

Methods: We selected a total of 281 patients including 117 with euthyroid goiter (Volunteers subjects VS) and 164 patients with suspect of CS. All patients, provided one salivary sample (h 23:00) for cortisol measurement by ECLIA (Cobas Roche) in an outpatient setting. If LNSC was increased the patients were invited to a brief hospitalization for the further investigations.

Results: LNSC in outpatients was significantly higher ($P < 0.005$) in suspected CS (1.02 ± 0.69 mcg/dl) compared with volunteer subjects (0.27 ± 0.14 mcg/dl). Among subjects with abnormal LNSC, two were VS, 35 were PC and 46 were confirmed CS. Only one patient with normal LNSC but with a strong clinical suspect, was affected by CS. In overall population the sensitivity was 97,9% and specificity 84,2% confirming the good performance of LNSC. In patients suspect for CS, the SE was 97,9% but the specificity was low 41,2%. In these patients the rate of false positive tests was elevated: 44% had increased value of UFC, 26.6% had an increased MSC and 14.6 % had an unsuppressed serum cortisol after DST. CONCLUSIONS This study confirms the utility of LNSC measured by routine automated assay as a screening test for CS. Although a normal LNSC value is useful to exclude Cushing's Syndrome, the specificity of LNSC is low in patients with PC who have a functional hypercortisolism. These data confirm that the differentiation between Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states is very difficult and requires additional tests.

P125

MARCATORI BIOCHIMICI DI QUALITA' OVOCITARIA IN PMA

R. Lanzano, N. Napolitano, T. Pagano, A. Lanzano, G. Lanzano

Lab. Bioch. Clin. SUN

Attualmente, nel protocollo standard di fecondazione in vitro, gli ovociti più idonei alla scelta per fecondazione, vengono selezionati in base ad una valutazione morfologica al microscopio, due o tre giorni dopo la fecondazione. D'altro canto alcuni lavori suggeriscono che anche l'analisi morfologica degli zigoti può essere indicativa di successo nella fertilizzazione in vitro. Su tali evidenze, note da diversi anni in letteratura, si basano i primi passi del lavoro di questa ricerca avendo come obiettivo quello di elaborare un sistema di scoring combinato (weighted score) che tiene conto dello score degli embrioni pre-impianto, dello score degli zigoti e del numero di blastomeri degli embrioni pre-transfer. Il sistema, una volta elaborato, è stato testato mediante un'analisi retrospettiva, al fine di valutare il suo valore predittivo in termini di percentuale di gravidanza e di tasso d'impianto. I dati ottenuti suggeriscono che il presente sistema di score combinato può essere utilizzato per stabilire una strategia nei cicli di fecondazione assistita per ridurre il numero di embrioni selezionati per il transfer, tutto ciò al fine di mantenere alte le percentuali di gravidanza riducendo l'incidenza di gravidanze multiple. In una seconda fase si è cercato di determinare l'esistenza di una eventuale correlazione tra livelli intra-follicolari di leptina e pentrassina (PTX3), e la percentuale di fertilizzazione ovocitaria, ed inoltre correlando ancora con il precedente sistema scoring embrionario testato. I risultati ottenuti evidenziano una correlazione positiva contemporanea tra i livelli intra-follicolari di leptina e PTX3 con il grado di maturazione ovocitaria intesa come "attitudine" alla fertilizzazione. Risulta inoltre evidente come la concentrazione intra-follicolare di leptina, a differenza di PTX3, non sia correlata in maniera significativa con lo sviluppo e la qualità degli embrioni. Se i risultati riportati troveranno conferma, la valutazione della concentrazione intra-follicolare di leptina e di Pentrassina (PTX3) possono rappresentare un'utile strategia nella selezione degli ovociti da destinare alle tecniche di fecondazione assistita.

P126

RUOLO DI AMINOACIDO OSSIDASI (LAAO) IL411 NELLA FUNZIONE ACROSOMIALE

R. Lanzano, A. Morello, S. Nappo Quintiliano, A. Lanzano, G. Lanzano

Dip: Bioch. Clin.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) posseggono un ruolo importante nella regolazione della qualità e funzione dello sperma umano. Scopo di questo lavoro è quello di chiarire quali meccanismi e quale ruolo svolgono le Interleuchine sugli spermatozoi umani ed in particolare la interleuchina-indotta gene 1 (IL411), un L ossidasi acido ammino (LAAO) che è in grado di generare ROS per esposizione aminoacidi aromatici in presenza di ossigeno. I substrati preferiti da questa IL sono la fenilalanina e triptofano mentre l'enzima si trova nella regione acrosomiale e nel tratto intermedio di queste cellule. L'attività enzimatica di LAAO viene persa quando lo spermatozoo perde la vitalità. Sugli spermatozoi umani è stato dimostrato che quando essi sono esposti alla fenilalanina ed al triptofano generano più bassi livelli di perossido di idrogeno. La stimolazione di attività LAAO porta all'induzione di diversi processi riguardanti le caratteristiche di capacitazione tra cui la fosforilazione della tirosina del flagello sperma e l'attivazione contemporanea di espressione fosfo-SRC. Inoltre, la stimolazione di LAAO comportò un aumento dei livelli di esocitosi acrosomiale sia in presenza che in assenza di stimolazione da parte del progesterone, tramite meccanismi che potrebbero essere invertiti in modo significativo dalla presenza di catalasi. Come è spesso avviene nei fenomeni mediati dai radicali liberi la cui esposizione prolungata nei riguardi degli spermatozoi umani accoppiata alla fenilalanina portò all'induzione di TFN-alfa e conseguente sintesi di Pentrassina lunghe (PTX3) che vengono prodotte dalle cellule endoteliali vascolari in risposta all'azione di TNFa e conseguente apoptosi come indicato da aumenti significativi di superossido mitocondriale e l'attivazione delle caspasi intracellulari. Questi risultati confermano l'esistenza di un LAAO negli spermatozoi umani con un potenziale ruolo nel guidare la regolazione redox di capacitazione degli spermatozoi e acrosomiale esocitosi.

P127

EVALUATION OF ENTECAVIR PLASMA PHARMACOKINETICS, INTRACELLULAR DISPOSITION AND PHARMACOGENETICS IMPACT ON RESPONSE TO ANTI-HBV TREATMENT IN A COHORT OF HB-E-AG NEGATIVE PATIENTS

A. De Nicolò, J. Cusato, L. Boglione, C.S. Cardellino, S. Allegra, G. Bonifacio, G. Cariti, G. Di Perri, A. D'Avolio

Dept. of Medical Sciences, Unit of Infectious Diseases, Amedeo di Savoia Hospital, University of Turin, Italy

To date, 350 million people are cronicly infected by Hepatitis B virus (HBV) worldwide. Among oral anti-HBV drugs, entecavir (ETC) is the most used: despite this, few data are currently available about its plasma and intracellular pharmacokinetics (PK) and pharmacogenetic (PG) factors associated with response. Furthermore, variability on genes involved in vitamin D (vit-D) pathway could play a role in response to HBV infection, since this is known to be a key immunomodulator. For these reasons, this work aimed to study ETC plasma/intracellular PK and PG factors related to its metabolism/distribution and to vit-D signaling.

HBeAg-negative infected adult patients treated with the standard dose of 0.5 mg/day of ETC were enrolled: plasma and peripheral blood mononuclear cells (intra-PBMCs) ETC concentrations were evaluated according to single nucleotide polymorphisms (SNPs) on following genes: CYP27B1, CYP24A1, VDR, UGT1A3, SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1, OAT1, OCT1, AK1, NT5C2, HNF4, ESR1, determined by RT-PCR. Drug plasma and intra-PBMC total (phosphorylated and not) ETC concentrations were measured with validated UPLC-MS/MS methods: intra-PBMC dosage was performed through a dephosphorylation protocol with acid phosphatase, followed by on-line SPE to obtain desalting and elimination of cellular contaminants. Results were normalized on the basis of real cellular volume (Simiele M. et al., 2014).

36 HBV infected patients were enrolled; PG results showed the influence of AK1 rs1109374 ($p=0.041$), CYP24A1 rs2248359 ($p=0.028$), CNT2 124 rs11854484 ($p=0.037$), CNT225 rs1060896 ($p=0.037$) SNPs on ETC plasma exposure; a significant association of CYP24A1 rs927650 ($p=0.020$) with ETC intra-PBMCs levels was found. By logistic regression analysis, CNT2 225 ($p=0.008$) and CYP27B1-1260 ($p=0.006$) SNPs resulted able to predict HBV-DNA decay at 3 months of therapy.

Concerning ETC PK, an intra-PBMC/plasma concentration accumulation ratio higher than 276 was found to be predictive for a HBV-DNA decay higher than 2 Logs ($p=0.028$, sens. 50%, spec. 87%; AUROC=0.741). Our work provides a new overview of ETC intracellular disposition, which actually lacks in literature, and new information about PG associated factors.

PK and PG evaluation could become important laboratory tools for therapy individualization.

P128

STABILITÀ A LUNGO TERMINE DEI VALORI DI CDT (TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE) IN CAMPIONI DI SIERO CONSERVATI A -20°C

A. Veronesi, C. Rota, N. Lelli, C. Carone, E. Cariani, T. Trenti

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

La CDT è il biomcatore di elezione per la diagnosi di elevato consumo cronico di alcol. Data la rilevanza medico-legale di tale dato, è importante stabilire modalità e tempo dichiarato di conservazione del campione, al fine di garantire un dato affidabile e rappresentativo. E' stata dimostrata la stabilità dei valori di CDT dopo conservazione a -20°C fino a 3 mesi.¹

Sono stati valutati 148 campioni di siero, risultati positivi al momento del prelievo (CDT >2.0%) mediante elettroforesi capillare (BeckmanCoulter) con il kit CEofix CDT (Analisis), conservati in provetta primaria a -20°C e mai scongelati. Sono stati selezionati in modo casuale campioni pervenuti nei mesi marzo-luglio degli anni 2011 (20 campioni); 2012 (28 campioni); 2013 (50 campioni); 2014 (50 campioni).

I valori medi di CDT al momento del prelievo erano di $3.1\pm 1.2\%$ (2011), $2.7\pm 1.0\%$ (2012), $3.1\pm 1.5\%$ (2013), $3.1\pm 1.5\%$ (2014). Gli stessi campioni nel maggio 2015 presentavano valori di CDT di $2.4\pm 1\%$ (2012 vs 2015: $p=0.023$); $3.0\pm 1.7\%$ (2013 vs 2015: $p=NS$); $2.9\pm 1.4\%$ (2014 vs 2015: $p=NS$). La diminuzione media dei valori di CDT era pertanto del 4.8% dopo un anno, del 5.3% dopo 2, del 10.4% dopo 3 e del 22.3% dopo 4 anni di conservazione a -20°C. La correlazione tra il dato originario e quello ottenuto dopo conservazione è risultata elevata (Spearman $r > 0.9$) indipendentemente dalla durata di conservazione. La conferma del risultato positivo (CDT >2.0%) è stata del 75% (2011), 68% (2012) e dell'86% (2013 e 2014). Tutti i campioni la cui la positività non è stata confermata avevano valori iniziali di CDT $\leq 2.4\%$. Per questi valori vicini al cut-off la positività è stata confermata nel 71% dei casi (n. 24) dopo 1 anno, nel 67% dei casi (n. 21) dopo 2 anni, nel 55% dei casi (n. 20) dopo 3 anni e in nessuno dei 5 campioni esaminati dopo 4 anni.

I risultati di questo studio mettono in evidenza un calo progressivo dei valori di CDT, anche in campioni correttamente conservati a -20°C e mai scongelati, da un iniziale 5% nei primi 2 anni fino a superare il 20% dopo 4 anni. Nei campioni con valori di CDT% vicini al cut-off, i risultati positivi non sono stati confermati nel 30% circa dei casi dopo 1 anno di conservazione.

1. Appenzeller BM, Wennig R. Altered Distribution of Transferrin Isoforms According to Serum Storage Conditions. Clin Chem 2005;51:2159-62.

P129

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DEL LINEZOLID (ZYVOXID) IN HPLC

A. Calcinari, A.M. Gambini, S. Marinelli

Lab. Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona

Introduzione: Il linezolid (Zyvoxid) è un antibiotico appartenente alla classe degli oxazolidinoni che inibisce la sintesi proteica batterica. Il trattamento è riservato alle infezioni da gram positivi come stafilococchi meticillino resistenti, pneumococchi penicillina resistenti, enterococchi vancomicina resistenti. Il linezolid è rapidamente e completamente assorbito dopo somministrazione orale. La somministrazione di 375-625 mg raggiunge la concentrazione massima di 12 e 18 mg/L dopo 1-2 ore. L'emivita è più bassa nei bambini (3-4 ore) rispetto agli adulti. L'eliminazione è renale e fecale, la dose non va modificata in caso d'insufficienza renale. SCOPO: Lo scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo per il dosaggio plasmatico del Linezolid in HPLC.

Materiali e metodi: Il metodo da noi messo a punto prevede l'aggiunta dello IS (oxacarbamazepina) ai campioni, calibratori e controlli seguita da deproteizzazione con CH₃CN. Al surnatante è aggiunta H₂O e HCl. I campioni vengono iniettati in colonna C18 5 µm 4, 6x150 mm, flusso 1,4 ml/min, detector UV/VIS 250nm. La fase mobile è costituita da: 0,8g CH₃COONa, 820 ml H₂O; 180 ml CH₃CN, ph 3,8. La corsa è di 30 min. I rapporti tra le altezze degli standards del linezolid e dello IS sono usati per costruire la retta di regressione ottenuta correlando tali rapporti con le rispettive concentrazioni; le concentrazioni dei campioni sono calcolate dall'equazione della retta di calibrazione.

Risultati: La retta di regressione $y = 0.2693x - 0.2528$ ($R^2 = 0.99$) è lineare nell'intervallo di concentrazione compreso tra 1 e 55 µg/ml. Il metodo ha un limite di quantificazione di 1 µg/ml e un recupero di 115,9±28.5%. La precisione e l'accuratezza sono ottenute analizzando in giorni diversi campioni a cui sono state aggiunte 2 differenti concentrazioni di Linezolid. I coefficienti di variazione CV variano dal 7.5% al 10% confermando come il metodo utilizzato risponda alle esigenze di un dato riproducibile e accurato. È suggerito il TDM del linezolid vista la criticità dei pazienti a cui viene somministrato e la sua grande variabilità nella concentrazione sierica.

Vinh DE, Rubinstein E. Linezolid: a review of safety and tolerability. *J Infect* 2009; 59(Suppl 1):S59-74.

P130

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA LC-MS/MS DELL'ETILGLUCURONIDE IN MATRICE CHERATINICA

C. Scapolla¹, F. Evangelisti², G. Petriccioni², I.M. Sbarbaro², P. Bucchioni²

¹Dip. Chimica, Università Genova

²Lab Analisi Tossicologia, Sarzana

Lo scopo del lavoro era quello di validare un metodo analitico LC-MS/MS per determinare la concentrazione dell'EtG nella matrice cheratinica. In questi ultimi anni, accanto ai marker tradizionali si è affiancata la determinazione, sia in matrici convenzionali (sangue, urina), sia alternative (matrice cheratinica), di prodotti minori del metabolismo non-ossidativo dell'alcol. L'esigenza nasce dal poter disporre di un marker dotato di alta specificità e sensibilità. Preparazione del campione: Taglio dei capelli alla radice in sede nucale; Campionare n° 2 aliquote (3 cm x 0.5 cm) aliquota A: Analisi.

aliquota B: Controanalisi

STEP 1-decontaminazione: 2x2mL di CH₂CL₂ con 10" di vortex. Asciugatura all'aria.

STEP 2-trattamento meccanico: Segmenti di 1-2 mm. Pesare un'aliquota di campione di 100 mg.

STEP 3-estrazione: Aggiungere al campione: 1000 mL di acqua MillQ, 50 mL di EtG-d5 (50 pg/mg). Vortex 1', Sonicazione per 30 minuti Tamb., Incubazione O.N a Tamb., Centrifugazione per 5' a 3500 rpm

STEP 4-Analisi LC-MS/MS: Iniezione di 30mL di surnatante.

Reagenti e calibratori

Fasi mobili HPLC:

Solvente A: Acqua e Acido formico 0.01%

Solvente B: Acetonitrile e Acido formico 0.01%

Post infusion: Isopropanolo

Sostanze pure per calibrazione

EtG Cerilliant

EtG D5 Cerilliant

Risultati:

Linearità: range 5-100 pg/mg; livelli di calibrazione: 6; replicati per livello: 3

Precisione intra-Day (RDS%) 5 pg/mg (6%) 10 pg/mg (5%) 30 pg/mg (3%)

Precisione inter-Day (RDS%) 5 pg/mg (11%) 10 pg/mg (9%) 30 pg/mg (6%)

Recuperi: 5 pg/mg (83%) 10 pg/mg (89%) 30 pg/mg (96%)

LOQ (S/N=10) 5 pg/mg LOD (S/N=3) 3 pg/mg

Conclusioni: L'obiettivo del lavoro era sviluppare un metodo che, compatibilmente con l'hardware a disposizione, fornisse la possibilità di distinguere i bevitori sociali e quelli cronici dagli astemi.

Il metodo LC-MS/MS sviluppato ha dato buoni risultati in termini di specificità, linearità, riproducibilità.

L'utilizzo della post-infusione ha permesso di ottenere la sensibilità richiesta: infatti il cut-off discriminante tra astemi e bevitori sociali da ottenere era 7 pg/mg, mentre quello discriminante tra bevitori sociali e cronici era 30 pg/mg.

P131

THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF ANTIEPILEPTIC DRUGS BY A LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) MULTIPLEXED HIGH THROUGHPUT ANALYTICAL METHOD

M. Conti, E. Pierini, D. Patrono, R. Mancini

Laboratorio Centralizzato S. Orsola, Bologna

Therapeutic drug monitoring (TDM) is commonly employed to optimize efficacy and avoid toxicity of antiepileptic drugs (AEDs). TDM has been applied mostly to the first generation AEDs. In the last twenty years, second- or third-generation AEDs have entered the European market and, despite they are generally characterized by a wider therapeutic ranges and less adverse effects than first generation drugs, they are also subjected to TDM in the clinics (1).

Whereas for first generation AEDs rapid analytical methods are available based on immunochemistry, second and third generation AEDs determination in biological fluids is commonly based on high performance liquid chromatography (HPLC) or, more recently, ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). Coverage of all these analytes by a single method is not possible with these techniques. On the contrary, according to the literature, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) could permit simultaneous determination of all these AEDs simultaneously (2).

We went to developed such a convenient assay for the simultaneous determination of all mentioned (first, second and third generation) AEDs employing an LC system (Prominence, Shimadzu, Japan) coupled to a tandem mass spectrometer (Q-trap API4000, AB-Sciex, Canada). The method required just a single manual step for blood plasma or serum protein extraction and precipitation, followed by dilution and instrumental analysis under chromatographic gradient and multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode (Figure 1) after electrospray (ESI) ionization both in positive or negative mode, depending on the analytes chemistry.

The method has been validated according to overall ISO 15089 indications for clinical laboratories and is currently applied to the TDM of all AEDs to fulfill clinical requests coming from various departments in our geographic area and abroad.

1. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, et al. *Epilepsia* 2008;49:1239-76.
2. Kang J, Park YS, Kim SH, et al. *Korean J Physiol Pharmacol* 2011;15:67-81.

P132

VERIFICA PRELIMINARE DELL'APPLICABILITA' DI UN METODO IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA ABBINATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA PER IL DOSAGGIO DEI FARMACI ANTITUBERCOLARI DI PRIMA LINEA IN PAZIENTI AMBULATORIALI

S. Paccagnini, C. Tirone, A. Masarin, C. Gechtman

Lab. di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Dip. di Medicina di Laboratorio, A.O. Osp. Niguarda Ca' Granda, Milano

La terapia della tubercolosi si basa sull'impiego dei farmaci di prima linea isoniazide (H), rifampicina (R), pirazinamide (Z), etambutolo (E) in associazione per un periodo di 6 mesi. E' raccomandata una stretta aderenza al trattamento da parte del paziente e un monitoraggio da parte dei sanitari per riconoscere tempestivamente eventuali effetti collaterali o un mancato miglioramento clinico.

Scopo: Valutare la compliance del paziente e se la posologia raggiunge una concentrazione sierica entro l'intervallo terapeutico. E' stato sviluppato un metodo in HPLC-MS per dosare simultaneamente le concentrazioni dei farmaci. Inoltre, si è provveduto a creare un protocollo operativo che comprendesse una corretta esecuzione del prelievo, trasporto e conservazione per garantirne la stabilità.

Materiali e metodi: Strumentazione: TSQ Quantum Access ThermoFisher, colonna C18, fasi mobili 0.1% HCOOH in H₂O e 0.1% HCOOH in CH₃OH. Metodo di estrazione liquido-liquido. Corsa analitica 6 minuti. Intervallo calibratori 0-8 µg/mL H e E; 0-80 µg/mL R e Z. Controlli interni di qualità basso/alto: 0.8/8 µg/mL H e E, 5.0/50 µg/mL R e Z. Standard interno: acido 6-aminopiridina-3-carbossilico per H,Z,E; rifabutina per R. Sono stati analizzati campioni di siero di 15 pazienti ambulatoriali. Il prelievo è stato eseguito a 2 ore dall'assunzione a 1,2,4 mesi dall'inizio della terapia. I campioni sono stati trasportati in contenitori refrigerati, centrifugati, separati, aliquotati e stoccati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Risultati: Linearità curve di calibrazione (R² da 0.93 a 0.99). Accuratezza % controlli (livello basso/alto): E (4.5/6.9); H (-2.3/-6.7); Z (-5.9/7.4); R (-4.9/-0.5). Precisione nella serie CV% (livello basso/alto): E (5.8/3.7); H (5.4/6.9); Z (5.9/3.7); R (8.2/6.7). Precisione totale CV% (livello basso/alto): E (7.2/6.1); H (8.9/10.6); Z (11.6/9.4); R (9.1/10.9). LOD (µg/mL): E ed H 0.25; Z 2.5; R 0.1. LOQ (µg/mL): E 0.5; H 0.4; Z 4; R 0.3.

Questo dosaggio ha permesso di rilevare la compliance ed eventuali interazioni farmacologiche.

Conclusioni: Si è dimostrata l'attuabilità del monitoraggio dei farmaci antitubercolari in pazienti ambulatoriali senza stravolgere i controlli periodici previsti dalle linee guida.

Song SH, Jun SH, Park KU, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:1331-8.

P133

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NOVEL LC-MS/MS METHOD FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF PLASMA VANCOMYCIN

S. Barco, I. Gennai, L. Barbagallo, A. Maffia, D. Bugnone, M. Talio, P. Bonifazio, G. Tripodi, G. Cangemi

Lab. Centrale di Analisi, Istituto Giannina Gaslini, Genova

Therapeutic drug monitoring (TDM) of vancomycin is of fundamental importance for therapy individualization because of large inter- and intra-patient variability, combined with correlation between low plasma concentrations and therapeutic failure on one hand and high plasma concentrations and toxicity on the other hand. In addition, the potential rise in minimum inhibitory concentrations of vancomycin target organisms makes it increasingly important to adjust its dosage in order to ensure adequate blood levels. We describe a simple and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of vancomycin from 100 µL plasma. Sample preparation was based on a fast protein precipitation and gradient separation. Chromatography was carried out using a Thermo Hypersil GOLD aQ C18 column. Mass spectrometric detection was performed using a Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole system. Ionization was achieved using electrospray in the positive ion mode. The performance and suitability of the assay have been evaluated by applying an extensive validation protocol based on international guidelines and by analyzing plasma samples from pediatric patients undergoing antibiotic treatment. Comparison of the new LC-MS/MS method with the current immunoassay used in our laboratory (Roche C601) showed a proportional difference in the two methods causing discordant clinical interpretation in about 10% of samples. The new LC-MS/MS method is fast, accurate, precise and cost-effective and it uses small plasma volumes. For these reasons it is suitable for the routine TDM of vancomycin in pediatrics.

P134

VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI DI UN NUOVO METODO PER TACROLIMUS AUTOMATIZZATO SU SISTEMI DIMENSION®

L. Brugnolo, A. Casarotti, M. Marinova, C. Artusi, M.C. Varagnolo, M. Zaninotto, M. Plebani

U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

Introduzione: Tacrolimus (FK-506) è un farmaco immunosoppressore utilizzato per ridurre il rischio di rigetto nei pazienti trapiantati. Le attuali strategie terapeutiche prevedono la somministrazione di basse concentrazioni di farmaco allo scopo di ridurre le note tossicità; quindi, per il TDM sono sempre più necessari metodi ad elevata sensibilità analitica.

Obiettivo: Confrontare un nuovo metodo proposto in commercio (Dimension®TAC, Siemens Diagnostics) con il metodo attualmente utilizzato nella routine di laboratorio (Dimension®TACR, Siemens Diagnostics), un metodo immunometrico con principio chemiluminescente (Tacrolimus ARCHITECT) e un metodo HPLC-MS/MS validato.

Materiali e metodi: Precisione: effettuata secondo il protocollo EP5A2 utilizzando tre materiali di controllo del commercio (Biorad) e cinque campioni di sangue EDTA (pool) da pazienti in trattamento con FK-506. Linearità: eseguita secondo il protocollo EP6A2. Sensibilità funzionale: utilizzati campioni di sangue intero (FK-free) con aggiunte di note concentrazioni di standard (3.0-0.5 µg/L). Accuratezza: valutata mediante il calcolo del bias verso le concentrazioni dichiarate nei campioni ricevuti per VEQ. Confronto tra metodi: eseguito su 130 campioni della routine. I risultati sono stati elaborati statisticamente con Analyse-it® Software (Ltd, UK).

Risultati: Imprecisione (CV%): QC (3.9 - 18.6 µg/L) <10.6% e pool (0.7 - 24.9 µg/L) <22.0%. Linearità: 1.1-28.2 µg/L. Sensibilità funzionale: 0.8 µg/L. Accuratezza: Bias per concentrazioni 2.0/8.0/10/20/30 µg/L <14%. Il confronto tra metodi evidenza: FK-506 [test TAC] = 1.23xFK-506 [test TACR]-0.16; Bland-Altman bias: 1.3 (0.9- -1.6, 95% CI). FK-506 [test TAC] = 0.93xFK-506 [ARCHITECT Tacrolimus test] +0.49; Bland-Altman bias -0.05 (-0.2- 0.3, 95% CI); FK-506 [test TAC] = 1.0xFK-506 [HPLC-MS/MS] +0.27, Bland-Altman bias: 0.56 (0.3- 0.8, 95% CI).

Conclusioni: Il dosaggio Dimension® TAC sembra essere promettente poiché presenta una migliorata sensibilità rispetto ai metodi immunometrici di confronto (test TACR 2.4 µg/L; ARCHITECT Tacrolimus test 2.0 µg/L), buona riproducibilità e una correlazione soddisfacente con metodi di confronto valutati. Il bias significativo rispetto a HPLC-MS/MS è probabilmente dovuto a cross-reattività dei metaboliti di FK-506.

P135

MISURAZIONE DI VANCOMICINA NEL LIQUIDO SINOVIALE DI PAZIENTI SOTTOPOSTI A REVISIONE DI ARTROPROTESI DEL GINOCCHIO: UTILIZZO DEL METODO QMS SU PIATTAFORMA CDX90

F. Luceri¹, F. Balboni², G. Balatro³, P. Pezzati¹, N. Cini¹, G. Virgili⁴, A. Baldini³

¹Lab. Generale, AOU Careggi, Firenze

²Lab. Analisi, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

³U. Ortopedia, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

⁴Dip di Chirurgia e Medicina Translazionale, Oculistica, Università di Firenze, Firenze

Introduzione: Il gold standard nel trattamento delle infezioni protesiche articolari è lo spaziatore in cemento antibiotato con vancomicina, da sola o in aggiunta ad altri antibiotici. L'eluizione del farmaco ha una funzione complementare alla terapia sistemica (1) e la misurazione delle concentrazioni di antibiotico, rilasciate nel post-operatorio nel liquido sinoviale (LS), è utile per valutare l'efficacia della procedura.

Scopo: verifica, su piattaforma CDx90, dell'utilizzo della metodica QMS (Thermo Scientific MA USA-Tema Bo Italia) validata per siero e plasma umano, per la misurazione della vancomicina sul matrice LS.

Materiali e Metodi: I Campioni di LS free prelevati in provette con EDTA, sono stati centrifugati e filtrati con Microcon YM10 per rimuovere le proteine. La soluzione madre di vancomicina (1 mg/mL utilizzando Vancomicina Mylan S.p.A. Milano) e i punti di calibrazione sono stati preparati in LS filtrato, con concentrazioni pari a 0, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL per la curva di taratura e di 2.5, 25 e 50 µg/mL per controllo interno.

Risultati: Il metodo è stato validato valutando i seguenti parametri: range di linearità da 0 a 100 µg/mL con $r^2=0.987$; limite di quantificazione pari a 2.5 mg/mL. La precisione entro la serie è stata valutata misurando 10 volte in un'unica seduta analitica tre campioni di LS a concentrazione bassa, media e alta (2.5, 25 e 50 µg/mL) ed il coefficiente di variazione è risultato rispettivamente pari a 5%, 1.8% e 3.2%. La precisione tra le serie è stata valutata analizzando gli stessi campioni in 10 giorni diversi ed il coefficiente di variazione è risultato rispettivamente uguale a 10.4%, 6.5% e 4.0%. L'accuratezza è stata valutata misurando la differenza fra il valore teorico ed il valore misurato nei tre stessi campioni di LS e la percentuale di recupero è risultata rispettivamente pari a 93%, 87% e 82%.

Conclusioni: La verifica della applicabilità del metodo di misurazione della vancomicina alla matrice LS è il presupposto per lo studio della cinetica di rilascio di antibiotico dagli spaziatori medicati. Il metodo QMS offre, con costi contenuti, sufficienti garanzie di precisione e accuratezza, oltre ad immediatezza e rapidità di utilizzo.

1. Fink B, Vogt S, Reinsch M, et al. Clin Orthop Relat Res 2011;469:3141-7.

P136

STUDIO RELATIVO ALLE PROBLEMATICHE ASSOCIATE ALL'ACCURATEZZA DELLA TECNOLOGIA LC-MS/MS NELL'ANALISI DELLE DROGHE D'ABUSO IN MATRICE URINARIA

V. Tazzari, S. Mengozzi

Lab. di Farmaco-Tossicologia, U.O. Corelab, Laboratorio Unico di Pievesestina, Cesena

La tecnica liquido cromatografica associata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) è ormai universalmente riconosciuta nell'analisi di conferma delle droghe d'abuso [1,2]. Si deve sottolineare il fatto che, anche se la sua elevata selettività e sensibilità ne ha favorito la diffusione, rimangono aperte alcune problematiche che possono inficiare la bontà dell'analisi soprattutto in termini di accuratezza quantitativa [3]. In questo poster, presentiamo uno studio interno che fa luce sulle principali cause di detti fenomeni (metodi preparativi, effetti matrice di sorgente) nell'ambito della determinazione quantitativa delle droghe d'abuso nelle urine. L'analisi delle droghe nelle urine è infatti soggetta a numerose interferenze associate sia alla variabilità del metabolismo che ad effetti matrice correlati alle reazioni ioniche molecolari che avvengono all'interno delle sorgenti ioniche commerciali [3]. Nell'ambito di detto studio sono state sviluppate, dal nostro laboratorio, alcune procedure necessarie al fine di monitorare, ottimizzare ed aumentare l'accuratezza delle analisi.

1. Tang MH, Ching, Lee YH, et al. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2014;969:272-84.

2. Cristoni S, Rubini S, Bernardi LR. Development and applications of surface-activated chemical ionization. Mass Spectrom Rev 2007;26:645-56.

3. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, et al. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. J Am Soc Mass Spectrom 2003;14:1290-4.

P137

MISURAZIONE DI TACROLIMUS: CONFRONTO TRA DUE METODI ANALITICI

N. Cini, F. Luceri, A. Terreni, P. Pezzati

Lab. Generale, Dip Servizi, AOU Careggi, Firenze, Italia

Introduzione: il Tacrolimus è un farmaco immunosoppressore dal basso indice terapeutico, utilizzato nei pazienti trapiantati. Per il suo monitoraggio sono utilizzati metodi immunometrici o cromatografici. Di riferimento è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), la cui implementazione necessita di importanti investimenti economici e di formazione del personale. I metodi immunometrici, di esecuzione rapida, relativamente semplice e diffusi in tutti i laboratori analisi, idealmente dovrebbero fornire risultati correlati con LC-MS.

Scopo: verifica della correlazione del nuovo metodo Dimension Tacrolimus Assay Siemens (TAC, Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown NY USA), sviluppato in accordo con le raccomandazioni 2007 European Consensus Conference on Tacrolimus Optimization (1), con metodo LC-MS in diluizione isotopica (4000 Q Trap, ABSciex, Framingham, MA USA). Materiali e Metodi: sono stati analizzati, nella stessa giornata, campioni di sangue EDTA, di pazienti trapiantati in terapia con Tacrolimus, sia in LC-MS che con metodo TAC. Complessivamente sono stati analizzati 150 campioni a vari livelli di concentrazione e la correlazione fra i due metodi è stata effettuata, in accordo con le linee guida CLSI EP9-A2, con la regressione Passing Bablok e l'analisi di Bland-Altman.

Risultati: l'analisi di regressione Passing Bablok evidenzia una slope di 0.8889 (95% CI 0.8431-0.9362) ed un'intercetta di -0.0722 (95% CI -0.3670-0.2127). I risultati dell'analisi di Bland-Altman sui 150 campioni mostrano una differenza media di 0.878 fra metodo TAC ed LC-MS, con un intervallo di confidenza del 95% da 0.6696 a 1.0857.

Conclusioni: la regressione Passing Bablok e l'analisi di Bland-Altman hanno fornito indicazioni omogenee riguardo alla buona comparabilità fra i due metodi. Il metodo TAC su piattaforma Dimension, di rapida e semplice esecuzione, non prevede alcun pretrattamento del campione, e, fornendo risultati affidabili relativi al monitoraggio terapeutico del paziente trapiantato, rappresenta un'ottima alternativa al metodo in LC-MS, per i laboratori che non possono implementare tale metodica.

1. Wallemacq P, et al. 10th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, settembre 9-14, 2007.

P138

INTRODUCTION OF BALL MILL WITH DISPOSABLE VIAL FOR HAIR PREPARATION IN DRUG ABUSE ANALYSIS

M. Barbaro, A. Motta, A. Soldarini, M. Locatelli

Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

Introduction: to analyse the hair samples in LC-MS/MS for the detection of drug of abuse and excessive alcohol assumption it is essential to cut in small pieces or to otherwise reduce the hair in small fragments to increase the surface of contact to facilitate the hydrolysis process (1). This procedure is time consuming and not cost effective.

Materials and methods: we compared 20 samples prepared with the usual laboratory procedure (cut with scissors) against the ball mill and then extracted and processed all samples in the same way.

Results: The samples prepared with both methods shown an increased recovery when prepared with the ball mill for the basic drugs while shown a slight decrease in recovery for the acid one.

Conclusions: The most relevant part in the hair preparation for mass spectrometry analysis is to increase the surface of the hair itself to facilitate the hydrolysis extraction of the metabolites contained without damaging them. The temperature raise with conventional ball mill and their need to be cleaned between each sample reduced their usefulness in the routine laboratory, which preferred the manual procedure with scissors. Now with the disposable sample vials and low heat generation by the ball mill is becoming more interesting and it is important to evaluate if the recovery of metabolite contained will increase with a more fine cut. We demonstrate that the recovery for the majority of the metabolites analysed increase with the smaller fragments and it is even possible to use smaller amount of sample to obtain the same results.

1. Mönch B, Becker R, Nehls I. Quantification of ethyl glucuronide in hair: effect of milling on extraction efficiency. Alcohol Alcohol 2013;48:558-63.

P139

**DIMINUIZIONE DEL TURNAROUND TIME (TAT)
INTRALABORATORIO DELLA TROPONINA
ATTRAVERSO UN PROCESSO DI MIGLIORAMENTO
ORGANIZZATIVO CONTINUO**

I. Conti, A. Carnevale, S. Pasqualetti, D. Szoke, A. Dolci, M. Panteghini

UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera 'Luigi Sacco', Milano

La troponina (cTn) è il marcatore di riferimento per la diagnosi di infarto acuto del miocardio. La sua determinazione richiede un'elevata accuratezza associata a TAT clinico, calcolato come tempo tra l'arrivo del paziente in Pronto Soccorso e la disponibilità del risultato, ≤ 60 min. Nel settore Core-Lab del nostro laboratorio monitoriamo in maniera continua il TAT analitico giornaliero (inteso come tempo dall'arrivo del campione in laboratorio alla disponibilità del risultato in reparto) di esami campione, tra i quali è inclusa la cTn. Il monitoraggio del TAT è eseguito dal 'middleware' LabOnLine in dotazione al Core-Lab. La cTn è determinata su campione di siero su due analizzatori gemelli Roche Cobas e411 'stand-alone', dopo esecuzione automatica dell'indice di emolisi (HI) per verificare una possibile interferenza sulla misura (interferenza per $HI \geq 100$). All'attivazione del Core-Lab, la centrifugazione della provetta e la determinazione del HI erano eseguite insieme a tutte le altre provette nella catena della 'total laboratory automation'. Solo dopo questo passaggio la provetta veniva trasferita al sistema Cobas per l'analisi. Inoltre, validazioni analitica e clinica dell'esame erano effettuate senza regole di autovalidazione. Con questo tipo di organizzazione, mediana del TAT intralaboratorio giornaliero e 90° percentile mostravano in media ($\pm SD$) valori di 60 min (± 19) e 113 min (± 36) (maggio 2014, n=26), ai limiti, se non oltre, l'obiettivo di TAT clinico. Sono state quindi introdotte le seguenti modifiche organizzative: 1) centrifugazione separata dedicata e stappatura delle provette a mano con caricamento diretto per l'esecuzione di HI; 2) trasferimento della misura di HI su un analizzatore fuori catena, con conseguente disponibilità della provetta per l'analisi di cTn subito dopo il campionamento per HI, 3) interfacciamento al 'middleware' degli analizzatori Cobas con impiego di regole di autovalidazione. In questo modo, TAT intralaboratorio mediano e 90° percentile (marzo 2015, n=26) sono scesi, rispettivamente, a 33,3 min (± 6) e 43,9 min (± 12), mostrando un marcato miglioramento ($P < 0,001$) rispetto ai valori ottenuti con la precedente organizzazione e permettendo di raggiungere l'obiettivo di TAT clinico ottimale per la quasi totalità dei campioni.

P140

**PRE-ANALYTICAL PHASE: SURVEY ON PATIENT'S
IDENTIFICATION PROCEDURE IN CLINICAL
DEPARTMENT**

A. Aita, S. Pigozzo, L. Sciacovelli, M. Plebani

Department of Medicine, University-Hospital of Padova

Background: Errors in Laboratory Medicine may depend on human errors or system deficiencies. The goal of reducing the number and minimize the risk for patient's safety must take into account the context of the entire organization trying to intercept and prevent latent deficiencies and the most critical activities.

Aim: This work aims to investigate the procedure carried out in clinical wards (CW) of the Hospital of Padua concerning patient's identification (PI) and incident reporting (IR) to monitor critical aspects.

Methods. The compliance with documented procedures and critical aspects in their application were investigated through a survey. 68 nurses from 15 CW, divided in medical (MA), surgical (SA) and paediatric (PA) areas, were interviewed.

Results: The PI process differs within different areas. Only the 11% of interviewed nurses from MA and SA carried out documented procedure, contrariwise emergency department staff of PA always applies procedures. PI, wristband printing and application are performed by the same person, as required, only in 54.5% of cases and they are not performed on all patients. Patients are identified using personal knowledge in 38.5% of cases in MA and in 75.8% in other areas. The congruity check of information reported on wristband and on labelled tubes occurs in 76.9% in MA and 42.5% in other areas. Despite the use of wristband, nurses (MA: 57.7%, SA: 44.4% and PA: 16.76%) report mistakes in the identification phase, detected mainly by themselves before sample sending (44.1%) or by Laboratory Medicine (42.6%). Concerning IR, interviewed nurses (MA: 53.8% and SA: 27.6%) refer not to be aware of the availability of procedures.

Conclusions: The study highlights a general lack of knowledge and application of procedures, especially in MA and SA. In order to improve the knowledge of procedures and staff awareness of the importance of their correct application for the safety of the patients, it is necessary: to review the workflow; a better divulgation of documents; and staff education and training.

Walling O, Soderberg J, Van Guelpen B, et al. Patient-centred care--preanalytical factors demand attention: a questionnaire study of venous blood sampling and specimen handling. *Scand J Clin Lab Invest* 2007;67:836-47.

P141

AUTOMATED IT-BASED INTERVAL POP-UP (POP-UP) HAS LITTLE IMPACT ON VITAMIN D (VITD) APPROPRIATE MINIMUM RETESTING

M. Pelloso, P. Fogar, A. Padoan, A. Legnaro, D. Basso, M. Plebani

Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Italy

Aim: Based on the UK National Minimum Retesting Interval Project Recommendations, we verified whether POP-UP allows appropriate VitD retesting (minimum=90 days).

Materials and methods: POP-UP was applied for one year to inpatients. One year VitD free (FREE-YEAR) and one year POP-UP (POPUP-YEAR) VitD requests were collected (LIS), comparing outpatients and inpatients. These were further classified as coming from medical, surgical, or maternal and child area. The number of patients with repeated VitD was identified for each area.

Results: VitD was requested once/year in 11.6% and in 13.1% and at least twice in 3.7% and 4.1% inpatients in FREE-YEAR and POPUP-YEAR respectively. Considering both in- and out-patients, VitD assay was offered to 35564 and 38217 patients in FREE-YEAR and POPUP-YEAR, being repeated at least twice in 15% and 13% ($X^2=42, p < 0.0001$). This reduction was confirmed among outpatients (from 11.3% to 9.4%), not among inpatients (24% unchanged). The time interval between repeated testing was shorter in POPUP-YEAR (128 ± 1 days) than in FREE-YEAR (179 ± 2 days, mean \pm SE) ($t=25.5, p < 0.0001$). Time interval between two repeated VitD measures was dependent on POP-UP ($p < 0.0001$), medical area ($p < 0.0001$), gender ($p=0.02$) and on VitD result ($p=0.0005$), not on age ($p=0.308$) (multivariate ANOVA). VitD retesting was classified as appropriate (>90 days) or non-appropriate (≤ 90 days). A significant decrease in inappropriate retesting was observed in POPUP-YEAR for inpatients belonging to medical ($p < 0.0001$) or surgical ($p=0.003$) areas, while it increased in the maternal and child area or remained unchanged among outpatients ($p=0.089$). For 4 months POP-UP was replaced by an IT-block for inpatients or a clinical comment for outpatients, causing a fall in retesting to 2.5%.

Conclusion: although POP-UP might determine a slight reduction in inappropriate VitD retesting, this approach does not render appropriateness a routine. Minimal retesting interval rejection rules appear a cheap and sustainable method toward more appropriate retesting.

Lang T. National minimum re-testing interval project. Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine 2013. <http://www.acb.org.uk/docs/default-source/guidelines/acb-mri-recommendations-a4-computer.pdf?sfvrsn=2>.

P142

SVILUPPO DI UN MODELLO PER L'IDENTIFICAZIONE DI UNA CHECK-LIST IN MEDICINA DI LABORATORIO: RISULTATI PRELIMINARI

A. Aita, R. Marin, E. Piva, L. Sciacovelli, M. Plebani

Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

Scopo di questo lavoro è descrivere i risultati preliminari di un progetto volto ad identificare un modello di CL applicabile all'intero processo del test di laboratorio.

Oggetto dello studio è la procedura del prelievo venoso, eseguita su pazienti afferenti ad ambulatori diversi per tipologia di paziente e organizzazione, ma sotto il controllo del laboratorio. Lo studio ha coinvolto 25 medici e 15 infermieri nel mese di settembre 2014. Le fasi del progetto comprendono: analisi della letteratura scientifica disponibile; analisi delle procedure mediante osservazione diretta; valutazione della prima bozza di CL con il personale coinvolto e scelta dei check points (CP); formazione del personale; breve periodo di sperimentazione; raccolta e analisi delle criticità; emissione della CL definitiva.

I CP inclusi nella CL sono: identificazione del paziente (IP); verifica della congruenza etichetta-campione-IP (E); selezione di vena (V) e ago (A); tempo di applicazione del laccio (L); riempimento (RP) e agitazione (AP) delle provette; condizioni di trasporto per tempo (TI) e temperatura (TE). 5661 CL sono state compilate e analizzate relativamente a 9469 prelievi eseguiti (59.8%). Le percentuali di compilazione nelle sedi ambulatoriali SMA, b e PN sono rispettivamente: 100 per IP ed E; 77.8, 71.0 e 58.5 per V; 97.8, 96.7 e 98.4 per A; 83.0, 85.8 e 90.6 per L; 99.0, 97.9 e 98.7 per RP; 98.4, 97.4 e 98.7 per AP; 28.0, 33.02 e 11.2 per TE; 20.8, 29.3 e 1.3 per TI.

I risultati, discussi con il personale, evidenziano la difficoltà di utilizzo della CL nelle fasce orarie di maggior accesso agli ambulatori. L'utilizzo della CL è ritenuto superfluo dal personale con esperienza e che ben conosce la procedura, ma particolarmente utile dal personale neoassunto e in addestramento. Difficoltà organizzative (carenza di sufficienti copie di CL disponibili, carente comunicazione del tempo di sperimentazione) hanno inficiato i risultati. Un'efficace CL, per prevenzione gli errori, deve includere solo i CP critici e necessari, essere compresa e condivisa dagli operatori, essere parte di un sistema di gestione della qualità.

Riferimenti. Hales B, Terblanche M, Fowler R, Sibbald W. Development of medical checklists for improved quality of patient care. *Int J Qual Health Care* 2008;20:22-30.

P143

A MANAGEMENT SYSTEM FOR QUALITY INDICATORS

A. Aita, L. Sciacovelli, M. Plebani

Department of Medicine, University-Hospital of Padova

Background: Even if ISO 1589:2012 requires the identification of quality indicators (QIs) and several laboratories use QIs, still lacks a harmonized QIs management system (QIs-MG) to record and report data. The work aims to describe the QIs-MG implemented in our department to comply with requirements of ISO 15189, and to report results obtained in the 2009 and 2014 years. Methods: International documents and scientific literature have been analysed to define QIs and QIs-MG. Data collected in 2009 and 2014 are compared to evaluate performance and validity of the proposed model.

Results: The QIs proposed by IFCC Working-Group Laboratory Errors and Patient Safety (WG-LEPS) is used. Was implemented a QIs-MG consisting of: a procedure describing all steps; for each QI a form reporting: wording, scope, processes involved, methodology, data collection frequency, limits for corrective actions, responsibilities; a computer system to standardize data recording and reporting. Some QIs data, collected in 2009 and 2014, are reported in terms of sigma values average: haemolysed samples (1.69-0.92); misidentified requests (outpatients: 2.2-0.7; inpatients: 0.64-0.1); unacceptable performances in internal quality control (3.93- 1.57) and in EQAS/PT (3.75-1.47); Turn around time (TAT) of Troponin I (minutes) in routine (143-116). Moreover the participation in interlaboratory comparisons proposed by IFCC WG-LEPS guarantees the evaluation of lab performance in terms of sigma with respect to those obtained by other laboratories.

Conclusions: Improvements of QIs data demonstrate the validity of implemented QIs-MG. QIs-MG and continuous interlaboratory comparison helped lab staff to identify corrective actions as the: releasing of a procedure concerning blood collection; implementation of a checklist focused on errors-prone areas to reduce unsuitable samples; organization of meetings with administrative staff to reduce errors in requests; regular verification of analytical performances to guarantee acceptable performances; reviewing of processes workflow to improve TAT.

Plebani M, Astion ML, Barth JH, et al. Harmonization of quality indicators in laboratory medicine. A preliminary consensus. Clin Chem Lab Med 2014;52:951-8.

P144

RISPARMIARE, MA NON A SCAPITO DELLA QUALITÀ: IL CASO DELLA PRE-ANALITICA DELLE UROCULTUREM.R. Cavallo¹, V. Granero¹, R. Sacco², C. Vella¹, E. Zanutto¹, D. Carpi¹¹S.C. Lab. Analisi, Ospedale di Pinerolo, ASLTO3²S.C. Direzione Sanitaria, Ospedale di Pinerolo, ASLTO3

Scopo del lavoro: Oggi è necessario conciliare spesa e qualità del dato clinico, pertanto, è indispensabile indagare variabili come la temperatura, il tempo e l'additivo che possono influenzare l'esito dell' urocultura ed essere utilizzate per ottimizzare il risparmio garantendo l'alto valore dell'analisi.

Metodologia: Sono stati esaminati 150 campioni di urocultura con Alfred 60 Alifax e AutionMax Menarini in due tempi: all'arrivo in laboratorio (t0) e dopo 6 ore (t6) considerando le variabili temperatura ed additivo.

I campioni positivi sono stati seminati su piastre cromogeniche per l'isolamento del germe e successiva identificazione e antibiogramma.

Risultati: I risultati alla rilevazione strumentale sono:

Campioni a temperatura ambiente, con additivo: t0 e t6 29 positivi (19%) + 121 negativi

Stessi pazienti, campioni a temperatura ambiente, senza additivo: t0 45 positivi (30%) + 150 negativi e t6 63 (42%) positivi + 87 negativi

Stessi pazienti, campioni refrigerati senza additivo: t0 44 positivi (29%) + 106 negativi e t6 45 positivi + 105 negativi
Veri positivi validati con la clinica 22 su 29 in quanto 5 con flora mista.

Conclusioni: La variabile che salvaguarda il dato è la presenza dell'additivo che permette di stabilizzare la carica senza alterarla, mentre la temperatura refrigerata in assenza dell'additivo comporta un aumento del 20 % di falsi positivi (FP).

La presenza dell'additivo inoltre garantisce la bontà del dato anche per campioni processati oltre le due ore, evitando FP dovuti a flore miste (31%) e permettendo di rilevare i veri positivi (VP) anche se l'analisi è eseguita oltre le due ore (corrispondenza letture t0 e t6 100%)

L'utilizzo della provetta con additivo, pur costando leggermente di più, permette una riduzione delle identificazioni e degli antibiogrammi inappropriati (23%) che oltre al costo non avrebbero valore in termini di salute e produrrebbero una spesa aggiuntiva in terapia antibiotica. Proponiamo dunque che l'additivo sia già presente nel contenitore di prima raccolta.

P145

PREANALYTICAL PROCESS AUTOMATION: PECULIARITY AND CRITICAL SITUATION ABOUT THE ATL EOSBIO SYSTEM

A.M. Basile, A.C. Radogna, A. Lassandro, A. Carone, M.P. Rizzo, S. Dimita

Centro Prelievi UOC di Patologia Clinica Osp. Miulli

Aim: The pre-analytical phase of the laboratory process is the most sensitive phase of error. Automation eliminates a wide range of high biological risk and error operations, lowering costs and enhancing human resources. From 2011, the Blood drawing Center - with patients outside the Division of Clinical Pathology at MIULLI Hospital - uses automatic labeling: first the Sprint Lab System (Radim Diagnostics) replaced in 2014 by the ATL EOSBIO system.

Materials and methods: The Blood drawing Center has approximately 60,000 patients per year for about 834,987 tests. It uses about 250,000 tubes and 75,000 biological samples to be labeled. The labeler EOSBIO ATL is an automatic system for tracking and preparing biological material during the draw blood phase. All tubes are properly labeled with the necessary information (patient id, barcode, department, date, test). The labeler supports nine different types of tubes, 6 automatically on programmable columns, 3 with manual loading, with level sensors on the warehouses of the tubes. The ATL system is equipped by a PC with a touch screen display, and a special printer for auxiliary labels, you can reprint the entire request of the patient or the single test tube. This system prepares all the drawing material (tubes with barcode) in a single bowl, eliminating the risk of exchanging persons or tubes and errors from inappropriate labels application. **Results:** The results are a greater fluidity of the blood drawing process, in addition to the significant decrease of errors when identifying a patient and the use of inappropriate test tubes.

Conclusions: Automation in the pre-analytical process has helped to improve the accuracy and efficiency of the laboratory process. Unfortunately the ATL system - currently used by the department - has some limitations compared to the Sprint Lab system (Radim Diagnostics) no longer on the market:

(insufficient warehouse for the tubes needed in a working day; replacement of articulated label rolls; lack of warning messages for patients already printed; elaborate procedure to switch to only print the labels, inability to label more than eight tubes per patient).

P146

LEAN THINKING: INTEGRAZIONE E OTTIMIZZAZIONE DELLE RISORSE DI DIVERSI DIPARTIMENTI AZIENDALI PER UNA MIGLIORE RISPOSTA AL PAZIENTE NEL PERCORSO TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE (TAO)

D. Nigris¹, F. Barbagli⁴, S. Vescovo³, F. Curcio³, V. Proietti², V. De Angelis², S. Gallo²

¹*Direzione Sanitaria, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine*

²*SOC Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine*

³*SOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine*

⁴*SOC Ingegneria Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine*

Scopo: Il percorso del paziente in TAO è condiviso tra due Dipartimenti, quello Trasfusionale deputato all'accettazione, prelievo e definizione della TAO e quello di Laboratorio incaricato della determinazione dell'INR. Il trasloco in una nuova struttura ha poi introdotto nuove variabili organizzative. Questi aspetti rendevano il processo TAO non lineare provocando incomprensioni tra gli operatori coinvolti e ritardi nella gestione della TAO.

È stato analizzato il percorso TAO esistente e proposto una nuova organizzazione con lo scopo di migliorare il servizio verso il paziente e la routine lavorativa di tutti gli attori coinvolti. La sfida è stata quella di trovare una soluzione Lean, ad isorisorse, che mettesse d'accordo tra loro molte figure professionali e di due differenti dipartimenti, riducendo sprechi ed ottimizzando i percorsi. **Metodi:** La metodologia Lean consiste nell'analisi dei processi, nella mappatura delle attività connesse al processo, nell'identificazione delle attività a valore e del loro fluire senza interruzione.

Per l'analisi dell'intero percorso TAO sono stati creati due gruppi di lavoro nei quali sono stati coinvolti Medici, Infermieri, Amministrativi e Tecnici di Laboratorio (TLB) mentre il coordinamento è stato svolto da un "Lean team leader" costituito da un TLB e da un Ingegnere Clinico. I due gruppi di lavoro hanno prodotto due analisi Lean distinte che sono poi state integrate tra loro per ottenere il miglior risultato possibile. Infine, tali proposte sono state sperimentate e monitorate per poter valutare la veridicità del modello ottenuto con la Value Stream Map.

Risultati: L'analisi Lean ha evidenziato un'organizzazione non aggiornata al nuovo assetto.

La nuova proposta organizza in "pacchetti" le attività così da rendere più efficiente ogni fase lavorativa.

Il principale risultato ottenuto è stato quello di liberare tempo/uomo per ogni attore interessato: principalmente medico, amministrativo e tecnico di laboratorio.

Conclusioni: L'analisi Lean ha risposto perfettamente alle nuove esigenze organizzative soprattutto all'interno di un sistema sanitario molto complesso al quale si chiedono maggiore efficienza ed efficacia con minori risorse possibili.

Lawal AK, Rotter T, Kinsman L, et al. Lean management in health care. *Syst Rev* 2014;3:103.

P147

SEGNALAZIONE VALORI CRITICI: REVISIONE

P. De Luca, S. Messina, M. Cirilli, F. Picciolo

U.O.C. Patologia Clinica Osp. "Fogliani" Milazzo ASP Messina

Introduzione: la identificazione dei "Valori Critici" rappresenta un aspetto importante nella interazione Laboratorio/Reparto con il fine di mettere a fuoco sollecitamente situazioni che possono essere decisive per la diagnosi e la modifica delle terapie così come suggerito da ISO15189, 2005 punto 5.8 ("Reporting of results") e da "Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations" (JCAHO), 2008.

Materiali e metodi: Dal maggio del 2014 dal nostro Laboratorio è stata standardizzata l'attività relativa alla segnalazione dei Valori Critici (già operativa in maniera informale dal 2001) attraverso un protocollo concordato con i vari reparti e ratificato in Direzione Sanitaria. Gli aspetti salienti riguardano: 1)l'elenco dei test interessati con relativo range di valori critici; 2)la tempistica e le modalità di segnalazione ai reparti; 3) la prassi di registrazione.

Prezioso il supporto del LIS che preimpostato correttamente allerta in tempo reale sui valori critici di nuova insorgenza tenendo in considerazione deltacheck e dati storici del paziente.

Risultati: Ad 1 anno è stata effettuata una verifica delle attività interne: le segnalazioni concernenti valori critici hanno riguardato 815 su 45632 accessi (1,78%); i reparti più coinvolti sono stati: Pr. Soccorso (44%), Rianimazione (13%), Medicina (11,9), Cardiologia (11,7); Nefrologia (6,9); i test più segnalati suddivisi per area laboratoristica: Biochimica (39,5%), Ematologia (29,4%), M.kers Cardiaca (23,2%), Coagulazione (7,9%).

In linea con le aspettative la distribuzione delle segnalazioni per i M.kers Cardiaca (Rianimazione 56,1%, Pr. Soccorso 34,9%, Cardiologia 9,0%.

Significativo anche il riscontro di 111 segnalazioni non conformi su 45632 accessi (0,24%) di cui: valori fuori dal range preimpostato (67,4 %), analiti non inclusi nel pannello (21,1%).

Conclusioni: La revisione in atto ha come fine l'identificazione delle criticità emerse così da approntare idonee misure correttive: in via preliminare ci si propone: 1) training sugli operatori di nuova immissione, 2) approfondimento sulle principali cause di errore preanalitico e sulle sostanze interferenti 3) sperimentazione nei reparti di un registro di ricevimento della notifica.

Lippi G, Caputo M, Banfi G, et al. *Biochim Clin* 2008;32:209-16.

P148

CONFRONTO FRA DUE MODALITA' DI MISURAZIONE DEL GRADO DI EMOLISI IN AUTOMAZIONE

F. Torelli, S. Secondini, A. Bevilacqua, A. Bedini, P. Dottori, B. Fileni, M.G. Scaloni, T. Schiavoni, P. Pauri

U.O.C. Patologia Clinica, Ospedale di Jesi, AV2- ASUR Marche

Scopo del lavoro: migliorare la gestione dei campioni emolitici in urgenza e routine (immediata segnalazione al richiedente, richiesta nuovo campione, ecc), secondo le Raccomandazioni SIBioC-SIMeL 2011, mediante il nuovo sistema di analisi di immagine in fase preanalitica.

Materiali e metodi: confronto fra i dati relativi alle misurazioni del grado di emolisi mediante telecamera QS1 (PVT), montata sulla strumentazione COBAS P-512 Roche pre-analitica in fase di taratura su campioni di riferimento e successivamente in routine e i dati ottenuti mediante fotometria sul sistema già in uso COBAS 6000 (Serum Index).

Dopo centrifugazione, la telecamera QS1 effettua una ripartizione automatica delle immagini, rispetto all'emolisi, in 3 diverse categorie (buono, leggermente emolitico, fortemente emolitico), le ordina e le aggiunge al database. Ogni campione viene letto, confrontando i valori di ciascuna immagine con i valori di riferimento stabiliti con la taratura ed esprimendo un valore percentuale di appartenenza ad una delle 3 categorie.

Il valore di SI si ottiene dalla lettura dell'assorbanza di campioni diluiti (NaCl 0,9%) a differenti coppie di lunghezze d'onda, che forniscono una rappresentazione semiquantitativa dei livelli di emolisi, correlata a g/L di Hb. Risultati: Nella fase di taratura si è valutato che un valore di SI >150 (per i quali i risultati vengono bloccati via software), corrisponde per la telecamera ad emolisi forte, un valore di 50-149 SI a emolisi debole, un valore <49 SI a emolisi assente. La successiva analisi di campioni consecutivi ha dimostrato che i due metodi, per quanto usino sistemi diversi di misurazione fisica dell'emolisi, danno risultati concordanti nelle categorie di emolisi forte ed emolisi assente, mentre alcune discordanze si osservano nella categoria intermedia.

Discussione e conclusioni: Entrambi i metodi determinano e quantificano in modo oggettivo in automazione l'emolisi. I risultati ottenuti indicano che è possibile integrare i 2 metodi per escludere nella fase pre-analitica i campioni fortemente emolizzati, limitando la misurazione del Serum Index ai campioni debolmente emolitici. Ciò permette di escludere il campione non idoneo dalla esecuzione dei test e la tempestiva comunicazione per ripetizione del prelievo.

P149

COMPARISON BETWEEN PROCALCITONIN AND C REACTIVE PROTEIN IN SEVERITY ASSESSMENT OF PEDIATRIC COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

L. Agnello¹, C. Bellia¹, M. Di Gangi², B. Lo Sasso¹, L. Calvaruso¹, G. Bivona¹, C. Scazzone¹, P. Dones², M. Ciaccio¹

¹Sez. Biochimica Clinica e Medicina Molecolare, Dip. di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli studi di Palermo

²UOC Malattie infettive pediatriche, Ospedale dei bambini G. Di Cristina, ARNAS, Palermo

Although the importance of serum Procalcitonin (PCT) levels at diagnosis is well established in adult systemic inflammation, its use remains controversial in pediatric Community-Acquired Pneumonia. The aim of our study is to investigate the role of PCT in the assessment of pediatric community-acquired pneumonia (CAP) severity and etiology.

This is a study involving 118 children with radiologic-documented CAP aged 1 to 14 years, without chronic diseases. Children who received antibiotics for more than 48 hours before admission, those with an underlying chronic respiratory disease, and those hospitalized for more than 48 hours were excluded from the study. Baseline PCT and routine laboratory tests were performed on admission. Serum PCT was measured by an enzyme-linked fluorescence assay (miniVIDAS BRAHMS PCT assay; Biomerieux, Lyon, France).

Eleven percent of patients had respiratory distress. Segmental and lobar consolidation on chest radiography were detected in 91% and 25%, respectively. A bacterial agent (*Streptococcus pneumoniae* or *Mycobacterium pneumoniae*) was detected in 41% patients. The mean value of PCT and PCR levels were 0.11 (0.05-0.58) ng/ml and 2.13 (0.42-4.81) mg/dl, respectively. No significant associations were found between PCT and respiratory distress, lobar or bilateral consolidation, pleural effusion nor bacterial etiology, while CRP levels were associated with lobar consolidation (P=0.007), pleural effusion (P=0.002), bacterial etiology (P=0.002). Interestingly, serum PCT was increased only for CRP higher than 4.9 mg/dl.

Our findings in children with CAP interestingly revealed a lack of association between serum PCT and disease features, such as etiology and severity. Remarkably, our results showed CRP serum levels were associated with lobar consolidation and pleural effusion.

According to our results, when dividing the study population according to CRP quartiles, PCT increased only in IV quartile, suggesting that hyperproduction of PCT occurs only for severe inflammation. Therefore, our study showed PCT is a flogosis marker in pediatric CAP but it is not better than CRP in the evaluation of the disease severity and etiology in this setting.

P150

RAPID MEASUREMENT OF CARBAPENEMASE ACTIVITY IN ENTEROBACTERIACEAE BY MEANS OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY- TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) APPROACH

M. Conti¹, D. Patrono¹, E. Pierini¹, R. Mancini¹, V. Franza², P. Severi², S. Ambretti²

¹Laboratorio Centralizzato S.Orsola, Bologna

²Microbiologia S.Orsola, Bologna

Bacterial resistance to antibiotics is a preoccupying phenomenon with a raising trend worldwide. Resistance to carbapenems is caused by bacterial expression of carbapenemase enzymes. A rapid determination of the presence and the degree of carbapenemase activity in bacterial isolates could pave the way to life-saving clinical interventions, such as timely changes in therapeutic regimens or dose adjustments, in the case of partial resistance. However, classical cultural methods for measuring bacterial resistance often require a few days to be performed. Therefore, an assay that could more rapidly determine carbapenemase activity of bacterial isolates would be extremely useful in the practice.

A few methods based on mass spectrometry have been published to this aim, employing Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) (1) or (18)O-labeling with Selected Reaction Monitoring (SRM-MS) (2). Technically, the former is not quantitative in nature and the latter not easy implementable in every laboratory. Thus, we developed a novel and simpler method to measure carbapenemase activity from bacterial isolates using the Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) approach.

Incubation of bacterial isolates with known amounts of meropenem leads to rapid carbapenemase-mediated drug hydrolysis. Residual meropenem concentration after incubation can be determined by LC-MS/MS, after the drug is extracted, separated from interferences by reverse-phase chromatography (on a Prominence HPLC system, Shimadzu, Japan) and detected by MS. We employed a q-trap API4000 (AB-Sciex, Canada) in specific multiple reaction monitoring (MRM) mode (Fig.1). Deuterated Meropenem-d6 was used as internal standard.

Meropenem residual concentration after 1 h of incubation, as determined by the LC-MS/MS method, correlates with carbapenemase activity, as determined by slower standard cultural tests. Preliminary data suggest that it could provide clinicians with a helpful tool in the rapid management of severely ill patients infected by carbapenemase expressing germs.

1. Wang M, Shen Y, Turko IV, et al. *Anal Chem* 2013;85:11014-9.

2. Hrabák J, Walková R, Studentová V, et al. *J Clin Microbiol* 2011;49:3222-7.

P151

INFEZIONE ATTIVA DA HBV NEI DONATORI DI SANGUE DELLA PROVINCIA DI NAPOLI

W. Utech¹, E. Assentato¹, C.M.P. Barberio¹, M. Caputo¹, G. Leone¹, M. Perrella¹, I. Sibilia¹, C. Lo Pardo¹, G.G. Di Costanzo²

¹U.O.S.S. *Immunodiagnostica dei trapianti e Centro NAT*, A.O. "Antonio Cardarelli", Napoli

²U.O.S.C. *Epatologia*, A.O. "Antonio Cardarelli", Napoli

L'infezione da HBV è responsabile di circa il 15% delle malattie epatiche croniche cause di ricovero in Campania e tale percentuale non si è modificata nell'ultimo decennio. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'incidenza e il trend annuale di infezione HBV, dal 2011 al 2014, nei donatori di sangue della Provincia di Napoli.

Sono stati screenati, dal 2011 al 2014, n° 333.688 donatori di sangue dei SIMT della Provincia di Napoli: A.O. "Cardarelli", A.O.U. "Federico II", IRCCS "Fondazione Pascale", A.O. dei Colli P.O. "Monaldi", ASLNA3 SUD P.O."Nola", A.O.Santobono-Pausilipon P.O."Pausilipon", ASLNA1 P.O."S.G.Bosco", ASLNA3 SUD P.O."S.Leonardo", ASLNA1 P.O."S.Paolo", A.O. "Seconda Università di Napoli".

Per i saggi molecolari (NAT) è stato utilizzato il sistema Cobas s201-MPX v.2 Roche Diagnostics.

L'incidenza d' infezione attiva da HBV (HBV DNA+) è stata di 208/100.000 donatori/4 anni (65.6% maschi).

Il tasso di prevalenza dell'infezione è rimasto stabile negli anni 2011, 2012, 2013 e 2014, essendo risultato pari rispettivamente allo 0.18%, 0.23%, 0.23% e 0.18%. Le decadi di età maggiormente interessate sono risultate quelle da 31 a 50 anni. In 53 soggetti (0,01%), classificati come OBI (Infezione B occulta), di cui il 68% maschi di età media 51 anni, è stata rilevata reattività al test NAT senza reattività all'HBsAg bensì all'HBcAb con o senza l'HBsAb, con e senza HBsAb a basso titolo (ELISA). La percentuale con OBI è rimasta stabile risultando dell' 8.1% nel 2011, del 10.5% nel 2012, del 6% nel 2013 e 2014 rispetto ai soggetti con HBV DNA+, in correlazione con i pazienti infetti HBV.

Dallo studio dei pazienti della Regione Campania, dopo l'effetto iniziale della vaccinazione anti-HBV introdotta nel 1991, la diffusione dell'infezione HBV a Napoli e Provincia è rimasta stabile negli ultimi anni.

Nella popolazione dei donatori di sangue della Provincia di Napoli, negli anni 2011-2014, l'infezione da HBV rispecchia la stabilità riscontrata nei pazienti. Nel nostro studio, in media il 7,6% dei soggetti infetti è portatore di infezione B occulta (OBI).

La salute degli Italiani nei dati del CNESPS ISS, giugno 2011.

P152

DISTRIBUTION PATTERN OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) GENOTYPES AND CORRELATION WITH VIRAL LOAD AND RISK FACTORS IN CHRONIC POSITIVE PATIENTS

A. Petruzzello¹, N. Coppola², G. Loquercio¹, S. Marigliano¹, F. Conte¹, L. Paradiso², G. Pasquale², C. Cacciapuoti¹

¹UOC *Medicina Trasfusionale, Dipartimento di Ematologia, IRCCS Fondazione "G.Pascale"*, Napoli

²*Clinica Malattie Infettive, Sun - Seconda Università' Di Napoli*

Introduction: Hepatitis C Virus (HCV) has emerged as a leading cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. The purpose of this study was to describe the distribution pattern of HCV genotypes in chronic hepatitis patients in the Campania region of Southern Italy and estimate their association with risk factors and viral load.

Materials and Methods: 404 consecutive HCV RNA positive patients were included in the study. HCV genotyping was carried out by HCV LiPA test and viral load estimation by Taqman Real time PCR system.

Results: The predominant genotype was 1 (63.6%), followed by genotype 2 (29.4%), 3 (6.2%) and 4 (0.8%). Subtype 1b was more frequent in females than in males. Conversely, genotype 3 was more frequent in males. No significant difference was observed in age distribution of HCV genotypes. Surgery and dental therapy was the most frequent risk factor for genotype 1, whereas intravenous drug abuse and tattooing for genotype 3. Patients with genotype 1 show more frequently high HCV viral load if compared to those with genotypes 2 and 3.

Conclusions: The present study revealed that HCV genotypes 1 and 2 accounted for over 95% of all the HCV infection in the Campania region and genotype 1 was associated more frequently with a higher viral load if compared to genotypes 2 and 3.

P153

VALUTAZIONE ANALITICA DEL METODO PHATFAST PRESEPSIN

L. Varraso, L. Nisi, F. Di Serio

Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico Bari, Bari

Il Phatfast presepsin (Mitsubishi) è un dosaggio immunoenzimatico in chemiluminescenza (CLEIA) per la misurazione quantitativa della presepsina. Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione analitica del metodo Phatfast Presepsin, la definizione dei valori di riferimento ed il confronto con procalcitonina (PCT) (Liaison Brahm's) in soggetti con sepsi batterica.

Materiali e metodi: Per la valutazione della precisione analitica, sono stati testati per cinque giorni consecutivi due livelli di controlli di qualità interni (QCI) (Mitsubishi) e un pool di plasma ottenuto da pazienti sani. Per la determinazione dei valori di riferimento sono stati testati campioni di plasma di 150 donatori, apparentemente sani. Per lo studio di comparazione, in 100 corrispondenti campioni di siero e plasma di pazienti con diagnosi di sepsi (emoculture positive), provenienti dall'U.O. Anestesia e Rianimazione del Policlinico di Bari, sono state eseguite le determinazioni della procalcitonina e della presepsina rispettivamente. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i software Mad Calc e Analyse-it.

Risultati: Studio di precisione. QC livello 1 (concentrazione media = 630 pg/mL): CV% tra-serie=1.39, CV% intra-serie=6.25, CVT% 1.4. QC livello 2 (concentrazione media =1765 pg/mL): CV% tra serie = 5.33, CV% intra-serie = 2.30, CVT % 5.03. Pool di plasma (concentrazione media =185 pg/mL): CV% tra-serie= 4.11, CV% intra-serie =2.16, CVT% 4.10. Il range di concentrazione nella popolazione sana era = 34.9 - 266 pg/mL. La concentrazione al 95 percentile era la seguente: limite inferiore = 50.4 pg/mL (intervallo di confidenza 34.9-56.1 pg/mL), limite superiore = 218.9 pg/ml (intervallo di confidenza 184-266 pg/mL). Studio di correlazione (range presepsina = 233-18289 pg/mL, range procalcitonina = 0.1- 2359 ng/mL): $r = 0.44$, $p < 0.001$.

Conclusione: I dati suggeriscono che il metodo Phatfast presepsin fornisce risultati riproducibili. Lo studio di correlazione indica che procalcitonina e presepsina correlano in pazienti critici con sepsi.

Okamura Y, Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). *Clin Chim Acta* 2011;412:2157-61.

P154

FEASIBILITY OF PROCALCITONIN REFLEX TESTING FOR EMERGENCY ROOM AND INTENSIVE CARE PATIENTS (PRELIMINARY RESULTS)

M. Lorubbio, B. Peruzzi, B. Salvadori, A. Fanelli, A. Ognibene

SOD Laboratorio Generale, Dipartimento dei Servizi, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi Firenze

Background: Debilitated patients admitted in emergency room or to the intensive care unit are more vulnerable to complications than patients in regular care units. In this patients an increased SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment), is associated with higher serum Procalcitonin (PCT) concentrations. In these wards, every day, during their monitoring, these departments require to the laboratory, many of hematology and clinical chemistry parameters. The aim of this retrospective study was to evaluate the predictive value of different laboratory and anagraphic parameters to add PCT determination.

Methods: Anagraphic and laboratory data for a total of 42 parameters from 4504 patients >18 years of age seen at the Emergency Room were collected. The parameters that showed a significant correlation were then entered into a multivariate analysis where the independent variable was the PCT results. For each parameter was calculated the sensibility e specificity and Area Under Curve (AUC) to determine the ability to predict the increase of PCT greater than 0.5 or 1.0 ng/ml.

Results: The main parameters which showed a high significance with levels of procalcitonin > 0.5 or 1.0 ng/ml (positive) were:

-the percentage of neutrophils (median 73%, SD 14.7 vs 83% SD 15.1), AUC=0.76

-Serum Urea (median 12:48 g/L, SD 0:38 vs. 0.81 g/L SD 0.68), AUC=0.70

-Serum creatinine (median 7.1 vs SD 0.92 1.81 SD 1.78), AUC=0.71

-Number of immature granulocytes (IG # x103 µl) higher in positive subjects (median 0.07, vs. 0.17), AUC=0.68

-Total protein lower in positive subjects (median 6.8 g/dL, SD 0.78 vs. 6.26 g/dL SD 0.89), AUC=0.68

The above parameters were used to construct a score of laboratory, using the cut off most effective for sensitivity and specificity. The score of laboratory >2 (has been given 1 when the values is greater than the selected cutoff and 0 when it was lower for the most significant parameters listed above) showed a sensitivity of 76% and 81% a specificity of 70% and 67% in predicting values of PCT higher than 0.5 and 1.0 ng/ml respectively.

Conclusion: These preliminary results are encouraging and indicate that a number of laboratory parameters, performed routinely, can make a substantial contribution to build an algorithm to identify those at risk of developing an infective complication not yet clinically evident.

P155

SOSPETTO CLINICO DI AMEBIASI: RILEVANZA CLINICA DEGLI ANTICORPI

A. Pocognoli, B. Cinti, M. d'Anzeo, R. Pergolini, T. Santini, M. Galeazzi

Laboratorio Analisi, A.O.U. Ospedali Riuniti, Ancona

Introduzione: L'Entamoeba histolytica, agente eziologico dell'amebiasi, è un protozoo patogeno per l'uomo. Si presenta in natura sotto forma di cisti infettanti e di trofozoiti; può comportarsi come commensale o invadere i tessuti causando infezioni intestinali o extraintestinali.

Materiali e metodi: Una donna italiana, R.P. di anni 26, si presentava al P.S. per diarrea persistente da circa 2 settimane, malessere generale e profonda astenia.

Risultati: Gli esami ematochimici non mostravano anomalie tranne una lieve ipereosinofilia (8,7% - vn <6%). L'eco addome rilevava anse intestinali a pareti ispessite con falda di versamento periviscerale in fossa iliaca destra e sinistra. La paziente riferiva nei mesi precedenti un soggiorno in India durante il quale non aveva seguito le norme igieniche consigliate, aveva assunto cibi locali; riferiva inoltre due episodi di alvo multiplo e febbre trattati con antidiarroici e fermenti lattici. La rettosigmoidoscopia evidenziava ulcere aftoidi nel retto distale, sigma medio prossimale, colon discendente. La ricerca microscopica dei parassiti nelle feci a fresco e dopo arricchimento, effettuata presso il Laboratorio Malattie Infettive, dava esito negativo. Gli esami ematochimici oltre a confermare l'ipereosinofilia, presentavano le seguenti positività: calprotectina >700 mg/kg (v.n. <50 mg/kg); sangue occulto nelle feci >1000 ng/ml (v.n. <40 ng/ml). Il quadro era compatibile con Morbo di Crohn. Il sospetto clinico di una parassitosi veniva però confermato dal dosaggio di anticorpi anti-amoeba (NovaTec) con valore di 16,4 U. Elisa (v.n.<10 U. Elisa) e con test in immunofluorescenza (Biomerieux) positivo con titolo di 1: 800. La terapia con Metronidazolo e Paromicina portava alla remissione dei sintomi e al miglioramento del quadro endoscopico.

Conclusioni: L'infezione di Entamoeba histolytica avviene per ingestione accidentale di cisti mature con alimenti o acqua contaminati. I comuni test di laboratorio possono essere poco indicativi e l'ipereosinofilia non sempre presente. Nel caso della paziente, la positività degli esami sierologici (Elisa e IFI) associati ad anamnesi ed indagini endoscopiche, sono stati fondamentali per fare diagnosi di infezione da Entamoeba histolytica.

P156

EFFECT OF CORONARY ATHEROSCLEROTIC BURDEN AND INDUCIBLE MYOCARDIAL ISCHEMIA ON CIRCULATING LEVELS OF HIGH SENSITIVITY CARDIAC TROPONIN T (HS CTNT) AND N TERMINAL PROBRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROBNP): RESULTS FROM THE EVINCI STUDY IN PATIENTS WITH STABLE ANGINAC. Caselli¹, C. Prontera², R. Ragusa³, M. De Graaf⁴, V. Lorenzoni³, D. Rovai¹, S. Del Ry¹, A. Scholte⁴, D. Neglia², A. Clerico³¹*Institute of Clinical Physiology, National Research Council, Pisa, Italy*²*Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa, Italy*³*Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy*⁴*Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands*

Background: Circulating levels of high sensitivity cardiac troponin T (hs cTnT) and N terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) are predictors of coronary artery disease (CAD) and long term prognosis in patients with stable angina.

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effect of coronary atherosclerotic burden and inducible myocardial ischemia on cardiac release of hs cTnT and NT-proBNP in a contemporary European population of patients with suspected CAD.

Methods: Hs cTnT and NT-proBNP were measured in 378 patients (60.1±0.5 years, 229 males) with stable angina and unknown CAD enrolled in the Evaluation of INtegrated Cardiac Imaging (EVINCI) study. All patients underwent stress imaging, by myocardial perfusion or wall motion imaging, to detect inducible ischemia, and coronary computed tomography angiography (CTA) to assess the presence of CAD (>50% stenosis of at least one major coronary vessel). An individual CTA score, expressing the coronary atherosclerotic burden, was calculated combining extent, severity, composition, and location of plaques.

Results: In the whole population the median (IQR) value of plasma hs cTnT was 6.17 (4.2-9.1) pg/mL and of NT-proBNP was 61.66 (31.2-132.6). In a multivariate model, CTA score was an independent predictor of the plasma hs cTnT (coefficient 0.06, SE 0.02, p<0.0003), while both CTA score and ischemia were predictors of NT-proBNP (CTA score: coefficient 0.06, SE 0.02, p=0.009; ischemia: coefficient 0.38, SE 0.12, p=0.001). When patients were subdivided according to the absence/presence of CAD and ischemia, hs cTnT concentrations were significantly increased in patients with CAD with or without inducible ischemia (p<0.005), while only patients with CAD and ischemia showed significantly higher levels of NT-proBNP compared with all the other groups (p<0.001).

Conclusions: In patients with stable angina, the presence and extent of CAD is related with increased levels of hs cTnT also in absence of ischemia. This suggest an ischemia-independent mechanisms of hs cTnT release linked with coronary atherosclerosis. NT-proBNP is a strong and independent predictor of obstructive CAD causing myocardial ischemia, thus identifying those subject at high risk of future events, probably requiring invasive procedure.

P157

PRE-ANALYTICAL EFFECTS ON ESTABLISHED AND EMERGING BIOMARKERS OF CARDIOVASCULAR DISEASE (CVD)

E. Gnatta¹, S. Moz¹, D. Basso¹, M. Pelloso¹, V. Aneloni², M. La Malfa¹, M. Plebani¹

¹Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Italy

²Unità Operativa Immunotrasfusionale, University Hospital of Padova, Italy

Background: plasma renin activity (PRA), an established marker of CVD, is going to be replaced by plasma renin concentration (PRC). HMGB1 and TWEAK are emerging CVD biomarkers. We verified pre-analytical processing (sample type, temperature and duration of storage, centrifugation protocol) on PRA, DRA, HMGB1 and TWEAK. IL8 was positive control.

Materials and methods: Blood from 10 donors was collected in serum(S), heparin, EDTA and citrate (Cit) tubes and kept at room temperature (RT) or refrigerated (COLD). For PRA and DRA a third series of EDTA tubes was chilled on ice (ICE). Samples were centrifuged one (1Centr) or two (2Centr) times after 30 minutes, 3 and 9 hours. Aliquots (-80°C) were analyzed within three months (immunometric assays).

Results: PRA median CV at 3 and 9 hrs were: 8.16% and 7.68% (COLD), 2.18% and 5.23% (ICE), 18.22% and 17.25% (RT), being intra-assay CV 9%. DRA intra-assay CV was 3.2%; median CV at 3 and 9 hrs were: 1.94% and 4.87% (COLD), 3.32% and 6.07% (ICE), 1.94% and 2.96% (RT).

S-HMGB1 was 10 fold lower than any other plasma type (F=7.14, p=0.002). Cit-HMGB1 median CVs at 3 and 9 hrs were lower than intra-assay CV (15%): 2.23% and 8.96% (COLD, 1Centr), 8.64% and 5.24% (COLD, 2Centr), 11.55% and 6.58% (RT, 1Centr), 7.51% and 8.56% (RT, 2Centr).

At 3 hrs TWEAK median CV was lower than intra-assay CV (5%) for all pre-treatments. The median 9 hrs CV varied from a minimum of 6.36% (RT, 2Centr) to a maximum of 11.37 (COLD, 1Centr). S-IL8 at RT, not at COLD, progressively increased at 3 (28+8 pg/mL) (p=0.0194) and 9 hrs (590+206 pg/mL) with respect to basal (7+3 pg/mL) (p=0.0250).

Conclusion: S-HMGB1 is not measurable, probably because it interacts with thrombomodulin; citrate plasma is recommended. TWEAK can be measured in any matrix. Refrigeration is not required for HMGB1, TWEAK and DRA.

Roszkopf S, Gyurján I, Roszkopf S, et al. The pre-analytical processing of blood samples for detecting biomarkers on protein microarrays. *J Immunol Methods* 2015;418:39-51.

P158

GENE THERAPY FOR DEVELOPMENT OF SAFE AND INNOVATIVE THERAPEUTIC STRATEGY TO REDUCE LDL IN FH PATIENTS

E. Leggiero¹, G. Labruna², M. Esposito³, S. Dalila³, F. Salvatore¹, L. Sacchetti¹, L. Pastore¹

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italy

²Fondazione IRCCS SDN, Istituto di Ricerca Diagnostica e Nucleare, Napoli, Italy

³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli 'Federico II', Napoli, Italy

Familial hypercholesterolemia (FH) is most well-characterized genetic hyperlipidemia due in most of the cases to mutations in the LDL receptor (LDLR) gene; FH is characterized by elevated concentration of plasma LDL cholesterol (LDL-C) with consequent deposition of LDL-C in tendons, skin and arteries. Drugs called statins can lower cholesterol levels but are not effective in all patients and removal of LDL from blood using a procedure called apheresis is often required; however, prognosis in these patients is still quite poor. In the past we have developed gene-therapy strategies based on liver transduction using PEGylated helper-dependent adenoviral (HD-Ad) vectors. However, intravenous administration is often associated to a host response that can narrow the therapeutic window and reduce the clinical applicability of gene transfer.

We have developed devising a safe and effective innovative therapeutic strategy with the objective of reducing for reducing LDL in these patients using a secreted protein. At this aim, we developed a helper dependent adenoviral HD-Ad vector for the introduction of a DNA segment capable of expressing high levels the expression of a soluble form of the extracellular portion of the human low-density lipoprotein receptor (LDL-R) fused in frame with rabbit transferrin (LDL-R/Tf) the TF-LDLR. This protein has been already proven capable of mimicking the function of the LDL receptor, the protein absent in the patients. We have, at first, evaluated the efficacy of the vector this chimeric protein in cellular models as 293, COS and CHOIdla7; subsequently, we have intravenously administered the HD-Ad vector expressing LDLR/TF and then demonstrated the ability efficacy of the above-mentioned vector in reducing total cholesterol levels in LDLR-deficient mice, the mouse model of FH. Our results demonstrated the safety and efficacy of this novel approach in vitro and in vivo. Additional experiments for the evaluation and represent the goal to perform additional studies to address the possibility of applying the TF-LDLR fusion protein of the efficacy of the LDLR/TF chimeric proteins expressed using alternative approach using different routes of administration are ongoing in order to develop to define a gene transfer a protocol more compatible with clinical applications.

P159

ENDURANCE EXERCISE INDUCES RELEASE OF CARDIAC TROPONIN T FRAGMENTS

S. Masotti¹, E.P. Cardinaels², M. Franzini³, C. Prontera⁴, M. Emdin¹, A. Clerico¹, A.M. Mingels²

¹Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Department of Clinical Chemistry, Maastricht University Medical Center, the Netherlands

³Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa

⁴Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa

Background and aim: Strenuous exercise can increase circulating levels of cardiac troponins (cTn), but it is unclear whether post-exercise released cTns belong to cytoplasmic intact monomer pool or myofibril-bound complex. It was hypothesized that cytoplasmic cTn monomers could be released by transient damage of sarcolemma while myofibril-bound by irreversible cellular damage, such as necrosis.

Aim of this study was to determine the influence of a prolonged physical activity on cTnT plasma levels and to describe the molecular forms of released cTnT.

Methods: Blood samples from 10 (70% male) marathon runners (42 km, 229±25 min) and 4 (75% male) cyclists (150 km, 408±45 min) were obtained before and after the competition; cTnT was quantified by hs-cTnT assay (Cobas 6000 Roche Diagnostics). Serum samples (1 ml) were analyzed by size exclusion chromatography (SEC; Sephacryl S-300, GE Healthcare) to separate and identify circulating cTnT molecular forms. SEC eluates were collected in 1.25 ml fractions where cTnT was quantified; serum albumin, myoglobin and NTproBNP (Cobas 8000 Roche Diagnostics) were measured in SEC fractions as internal standards.

Results: cTnT increased significantly in studied athletes from, median (25th-75th percentile), 3.5 (3.0-8.7) ng/L at baseline to 86.2 (49.8-130.2) ng/L post race ($p < 0.0001$), thus reaching cTnT levels above the 99th percentile (14 ng/L). SEC analysis of post race serum samples showed only one peak with retention time of 180 min corresponding to cTnT degradation fragments ($MW \leq 18$ kDa). The peak was identified thanks to column calibration with purified human cardiac T-I-C complex (MW 76 kDa), free cTnT (MW 40 kDa) and by comparison to cTnT elution profile of AMI patients which is characterised by the presence of cTnT monomer and its degradation fragments of 29 kDa and 18 kDa.

Conclusions: We found that cTnT levels significantly increased in athletes after completing a strenuous and prolonged exercise such as marathon or cycle competition. Interestingly we observed that this increase was associated with the release of a single degradation fragments, thus the identification of a specific molecular pattern of plasma cTnT could be useful to identify subclinical cardiac damage.

Cardinaels EP, et al. Time-dependent degradation pattern of cardiac troponin T following myocardial infarction. Clin Chem 2013.

P160

GALECTIN III IN PATIENTS WITH HEART FAILURE

S. Valverde¹, F. Antico¹, M.M. Salvadego¹, F. Gessoni¹, L. Valle², E. Garelli², R. Valle², G. Gessoni¹

¹Clinical Pathology Dept., Ospedale di Chioggia

²Cardiology Dept., Ospedale di Chioggia

Background: Galectins are a family of soluble β -galactoside-binding lectins that have important role in inflammation, immunity, and cancer. Galectin-3 (G3) as a part of this lectin family plays a very important role in development of heart failure (HF). This preliminary paper summarizes our experience in evaluation of G3 in heart failure patients and normal subjects.

Materials and Methods: We considered 26 HF patients and two control groups 25 blood donors (BD) and 18 athletes observed in our sport medicine service (SM). Galectin 3 was evaluated using a commercial assay supplied by Abbot and an automated Architect 1000 analyzer. Results were reported as mean±1SD, data comparison was performed by using a Student t test and a values $p < 0.05$ was considered as statistically significant. **Results:** Among HF patients G3 concentration was 29.2±22.1 ng/mL, this value was significantly higher ($p < 0.001$) in comparison with values observed in BD (12.7±5.25 ng/mL) and AA (9.8±1.5 ng/mL), these results are reported in Figure 1. In this little subjects series we observed an experimental cut-off at 13.0 ng/mL. As reported Figure 2 using this experimental cut-off we observed an Youden index of 0.78, an area under curve of 0.91, a Sensitivity of 1.00, a Specificity of 0.79, an incidence of correctly classified of 0.90

Conclusions: Data that we report in this paper are of course extremely preliminary and limited to a small number of subjects. There seem, however, interesting to the clear discrimination between the values of G3 observed in the group of patients with HF compared to two control groups BD and SM. Obviously these preliminary results require further confirmation and have been processed a larger study that arises not only aims to recruit a greater number of subjects but to relate the approach mulimarkers (brain natriuretic peptide, high sensitivity troponin, cystatin and creatinine) with the study of cardiac function.

P161

LA GESTIONE DEL PAZIENTE CON SOSPETTA SINDROME CORONARICA ACUTA: REVISIONE DEL PROTOCOLLO DIAGNOSTICO

F. Deiana¹, G. Devoto¹, V. Marrè¹, P. Iandolo¹, P. Ferrogiaro², F. Greco²

¹Laboratorio Analisi Centrale, ASL 4 Chiavarese, Ospedale Lavagna

²Dipartimento Informatico e Tecnologico, ASL 4 Chiavarese

Introduzione: il protocollo diagnostico della Sindrome Coronarica Acuta (SCA) prevedeva sino al 2013 la determinazione delle concentrazioni plasmatiche della Troponina T (Troponina HS, Roche) all'ammissione (T0) e dopo 6 ore (T1)¹. Dal Gennaio 2014 nel nostro Laboratorio è utilizzata la metodica Access AccuTnI Beckman, pertanto abbiamo riesaminato il protocollo diagnostico delle SCA utilizzando un'analisi retrospettiva su una casistica non selezionata di pazienti afferenti al DEA con sospetta SCA.

Materiali e Metodi: sono stati arruolati 2834 Pazienti. Sono state diagnosticate 258 SCA (9.1%). Le concentrazioni plasmatiche di Troponina I sono state determinate con metodica Access AccuTnI su analizzatore DXI (Beckman): LoB < 10ng/L, LoD 10 ng/L, LoQ 40 ng/L con CV 10%. Gold Standard sono state utilizzate le diagnosi di dimissione.

Risultati: in 63 Pazienti, con diagnosi di SCA, le concentrazioni plasmatiche di Troponina I al T0 erano nella norma; in 57 la Troponina si è positivizzata al T1. I 6 Pazienti con Troponina normale sono stati ricoverati (Troponina sempre negativa). Le performance dei test risultati al T0 e T1, sono stati i seguenti: Tutta la popolazione: Sensibilità 99%, Specificità 89%, VPP 31%, VPN 99,9%, Cut off proposto 39.6 ng/L; Maschi Sensibilità 99%, Specificità 86%, VPP 35,8%, VPN 99,4%, Cut off proposto 39,6 ng/L; Femmine Sensibilità 98%, Specificità 87%, VPP 28,6%, VPN 99,2%, cut off proposto 46,2 ng/L. Abbiamo inoltre valutato l'aderenza al protocollo: 70% Pazienti 1 Prelievo, 25% Pazienti 2 Prelievi, 5% 3 o più prelievi. 990 Pazienti sono stati dimessi con Troponina al solo T0, 399 T0+T1; di questi 117 con Troponina patologica ma con cinetica non significativa (ovvero inferiore al 100%).

Discussione e Conclusioni: i risultati ottenuti dimostrano: A) la Troponina I Access AccuTnI Beckman e la Troponina T HS Roche, mostrano nella nostra casistica clinica performance diagnostiche sovrapponibili; pertanto non si modifica il protocollo diagnostico. B) si conferma il cut off proposto dalla Beckman. Successive indagini per validare i differenti cut off legati al sesso. Referenze 1) L'impatto della Troponina ad Alta sensibilità nella gestione del Paziente con sospetta sindrome coronarica acuta. SIBIOC 2012.

P162

VALUTAZIONE DELL'UTILITÀ DEL NT-proBNP NELLA DIAGNOSTICA URGENTE DELLO SCOMPENSO CARDIACO

A. Giacomini¹, A. Barchitta², H. Afshar¹, M. Miolo¹, L. Ruzza², D. Foresti², A. Da Boit¹, M. Chiesa², P. Carraro¹, M. Plebani¹

¹Dip. Interaziendale Medicina di Laboratorio, ULSS 16-AOP-Università di Padova

²Dip. di Emergenza, Osp. S. Antonio, Padova

Introduzione e scopo: Abbiamo valutato retrospettivamente, in collaborazione con il Pronto Soccorso (PS), l'appropriatezza della richiesta e l'efficacia clinica e organizzativa dell'NT-proBNP nella gestione in urgenza del paziente con sospetto di Scompenso Cardiaco (SC).

Materiali e metodi: NT-proBNP è stato determinato con metodo LOCI su Dimension EXL (Siemens Healthcare Diagnostics, USA), con livelli decisionali per la diagnosi di patologia cardiaca: <300 ng/L per esclusione; >450 ng/L per alta probabilità (<50a); >900 ng/L per alta probabilità (>50a). Per ogni richiesta sono stati valutati: il motivo principale, l'appropriatezza, la diagnosi di dimissione dal PS, l'esito dell'ecografia cardiaca se eseguita, le comorbidità, l'efficacia organizzativa e clinica. Sono state esaminate 679 richieste di NT-proBNP pervenute dal PS in 4 mesi (pari al 7% degli accessi dello stesso periodo), in 130 casi seguite da ecografia cardiaca.

Risultati: Motivo principale di richiesta è stato la dispnea (53.4%), seguito da: cardiopatia (34.8%), edemi periferici (32%) e SC noto (18.4%). Fra le comorbidità registrate è prevalsa l'ipertensione (49%), seguita da aritmie (37.7%), malattie polmonari (37.2%) e metaboliche (28%). L'NT-proBNP ha escluso la patologia cardiaca in 141 casi (20.7%), era compatibile in 416 casi (61.3%). La diagnosi di dimissione dal PS è stata di SC in 200 casi (29.4%), confermata in 65 casi dall'ecografia cardiaca. La richiesta dell'NT-proBNP è risultata appropriata in 469 casi (69%), ma nel 13% dei casi si trattava di pazienti con insufficienza renale. Il test ha favorito la dimissione sicura del paziente in 119 casi (17.5%) e ha contribuito a suggerire il ricovero in 360 casi (53%). Il test ha contribuito ad individuare un percorso diagnostico terapeutico in 377 casi (55.5%).
Discussione e conclusioni: L'NT-proBNP nella nostra valutazione si è dimostrato efficace nella gestione in urgenza del paziente con sospetto di SC in un'alta percentuale di casi. La sua utilità può essere migliorata aumentando l'appropriatezza della richiesta e riducendo di conseguenza la frazione di risultati in zona grigia che richiedono ulteriori approfondimenti.

Carraro P. Esami di laboratorio raccomandati in alcune tipiche situazioni di Pronto Soccorso. Biochim Clin 2011;35:207-28.

P163

BIOMARKERS OF ABDOMINAL AORTA ANEURYSM CALCIFICATIONE. Crescini¹, L. Caimi¹, S. Bonardelli², A. Giacomelli¹, M. Peroni², E. Garrafa¹¹*Dept. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Italy*²*Vascular Surgery, Dept. of Clinical and Experimental Sciences, University of Brescia, Italy*

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a degenerative dilatation of the distal aorta. Efforts to limit the mortality rate from AAA rupture, that causes approximately the 10th -12th cause of death in industrial countries, depend on early detection and elective AAA repair. Even if different authors have demonstrated that risk of rupture increases exponentially with maximal aortic diameter, often reporting the relationship with systemic inflammatory markers, other additional risk factors have already been identified and tested intensively. In particular retrospective studies examining the computed tomography scans of non-ruptured and ruptured AAA patients have positively linked calcification to an increase in AAA rupture. Varying degrees of calcification have been found to exist in most AAA and the risk of rupture is associated with the degree of calcification. Evolution of calcification is often progressive and lack of established prognostic indices makes repeat imaging to monitor AAA expansion necessary.

Since calcification has been shown to be a sign of a degenerative inflammatory process involved in the arterial wall, the aim of our study was to identify circulating markers that accurately reflect inflammatory activity or aortic wall calcification that could potentially aid substantially in the identification of appropriate patients for different monitoring protocols and intervention.

The study was performed in samples of 83 Caucasian patients admitted to the Surgery Department for AAA resection. Demographic and clinical characteristics of the patients were collected and AAA classified on the basis of the degree of calcification that was correlated with the values of inflammatory markers tested. In particular we evaluate classical inflammation markers such as VES, WBC, fibrinogen and CRP. We found that several biochemical parameters show a different expression pattern associated with aneurysm calcification and its evolution.

The results of our study support the use of some biochemical markers to assess calcification and its progression. They could be used in triaging patients to identify patients who should undergo rapid imaging, thus allowing for prompt initiation of treatment or rule-out suspicious patients from non essential repeat imaging.

P164

HYPERURICEMIA AS AN INDEPENDENT RISK FACTOR FOR CORONARY HEART DISEASE (CHD) INCIDENCE AND MORTALITY IN THE GENERAL POPULATION: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

F. Braga, S. Pasqualetti, S. Ferraro, M. Panteghini

Centre for Metrological Traceability in Laboratory Medicine (CIRME), University of Milan, Milano

Three previously published meta-analyses reported no significant or weak association between hyperuricemia (HU) and CHD incidence and a weak association between HU and CHD mortality. In this study we updated the literature search, systematically reviewing retrieved papers by using well defined selection criteria, also trying to identify the uric acid cutoff above which the risk becomes significant. The peer-reviewed literature published up to December 2014 was searched using the Medline and Embase databases. We included only prospective cohort studies involving adults (sample size ≥ 100) with no cardiovascular disease (CVD) or gout diagnosis at selection and a follow-up of at least one year. Studies were also excluded if they generally considered as outcome the CVD incidence/mortality without separately reporting data on CHD, evaluated outcomes without reporting defined uric acid thresholds, did not adjusted for major confounders and if the 95% confidence interval (CI) for risk ratio (RR) was not available or computable. To calculate overall combined effect size (ES) the random effect model was used. All quantitative data of selected studies were uniformed as RR as ES, with corresponding CI. For CHD incidence, 12 populations from 9 studies were included, with an overall sample size of 457,915 subjects (53.7% males). For CHD mortality, 7 populations from 6 studies were included, with an overall sample size of 237,433 subjects (66.3% males). The overall combined RR were 1.206 (CI: 1.066-1.364, P=0.003) for CHD incidence and 1.209 (CI: 1.003-1.457, P=0.047) for CHD mortality, respectively, in heterogeneous sets of studies. Subgroup analysis by gender showed a marginal (incidence) and not significant (mortality) association between HU and CHD in men, but an increased risk for CHD incidence and mortality in hyperuricemic women (RR 1.446, CI: 1.323-1.581, P <0.0001, and RR 1.830, CI: 1.066-3.139, P=0.028, respectively). The risk markedly increases for serum uric acid concentrations >7.0 mg/dL. In conclusion, HU appears to increase the risk of CHD events in the general population, mainly in adult women. Due to the availability of few studies, this finding should, however, be further investigated in specifically designed researches.

P165

DETERMINAZIONE DELLA COPEPTINA NEL PAZIENTE CON SOSPETTO INFARTO MIOCARDICO ACUTO: UN VALORE AGGIUNTO?

M.M. Mion¹, L. Schiavon¹, A. Casarotti¹, M. Zaninotto¹, S. Vigolo², G. Vettore², L. Babuin³, M. Plebani¹

¹UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italia

²Dipartimento di Emergenza e Urgenza, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova, Italia

³Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italia

Negli ultimi anni la copeptina è stata studiata prevalentemente nell'ambito delle patologie cardiovascolari, valutandone in particolare l'utilità nel rule-out dell'infarto miocardico acuto (IMA). In questo studio sono state confrontate accuratezza diagnostica ed efficacia nel rule-out dell'IMA di due diverse strategie: (A) troponina cardiaca I (cTnI) positiva all'ammissione in pronto soccorso (PS) o dopo 3-6 ore; (B) cTnI o copeptina positiva all'ammissione. Nel periodo 01/10 - 10/10/2014 sono stati arruolati 97 pazienti (pz) >18 anni (53M+44F; età mediana 74 anni, range 19-100) ammessi in PS con sintomatologia suggestiva di possibile IMA, escludendo i pz con trauma toracico e IMA diagnosticato all'ECG. La cTnI è stata determinata con il metodo LOCI (Dimension Vista, Siemens Health Care Diagnostics; cut-off=0.045 µg/L) mentre la copeptina è stata misurata con il metodo BRAHMS Copeptin-us KRYPTOR (KRYPTOR Compact Plus, Thermo Fisher Scientific; cut-off=10 pmol/L). I 97 pz arruolati (copeptina mediana 9.6 pmol/L, RIQ 4.7-30.7) presentavano le seguenti diagnosi principali e valori di copeptina (mediana pmol/L, RIQ): 7 IMA (16.1, 8.5-19.9), 9 angina instabile (6.6, 4.5-15.0), 9 edema polmonare acuto (116.1, 20.9-486.9), 22 altra patologia cardiaca non ischemica (16.9, 5.3-32.0), 22 patologia non cardiaca (13.8, 6.0-49.6), 28 dolore toracico di n.d. (4.7, 3.4-8.8). All'ammissione, 25 pz (26%) presentavano cTnI positiva (>0.045 µg/L) e 47 pz (48%) copeptina positiva (>10 pmol/L). All'analisi ROC, l'AUC della strategia (A) (0.84, 95% IC 0.79-0.89) risultava significativamente superiore (p <0.0001) a quella della strategia (B) (0.73, 95% IC 0.68-0.79). Sensibilità e valore predittivo negativo erano pari al 100% per entrambe le strategie, mentre specificità (68% vs 47%) e valore predittivo positivo (19% vs 13%) risultavano più elevati per la strategia (A). In conclusione, entrambe le strategie hanno dimostrato la stessa efficacia nell'esclusione (rule-out) dell'IMA ma non la stessa accuratezza diagnostica. La strategia (A) ha dimostrato una maggiore specificità anche se la strategia (B) potrebbe consentire una dimissione più rapida dei pz che risultassero negativi ad entrambi i biomarcatori già all'ammissione, favorendo un migliore e più razionale utilizzo di risorse in PS.

P166

HIGH SENSITIVITY TROPONIN T 99TH PERCENTILE ACCORDING TO AGE IN PATIENTS WITH NON-SPECIFIC CHEST PAIN

F. Cappellini¹, S. Da Molin², R. Falbo¹, S. Signorini¹, F. Avanzini³, D. Saltafossi³, P. Brambilla⁴

¹S.C. Analisi Chimico Cliniche, A.O. di Desio e Vimercate, P.O. di Desio, Desio (MB)

²S.C. Analisi Chimico Cliniche, A.O. di Desio e Vimercate, P.O. di Vimercate, Vimercate (MB)

³U.O.C. di Cardiologia/UTIC, A.O. di Desio e Vimercate, P.O. di Desio, Desio (MB)

⁴Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Monza (MB)

Introduction: the Global Task Force for the Third Universal Definition of Myocardial Infarction has advocated the usage of the 99th percentile of the reference population for cardiac troponins as the decision level for diagnosis of Acute Myocardial Infarction (AMI). The present 99th %ile Upper Reference Limit (URL), 14 ng/L, for high sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT), has been defined with few studies of small cohorts of apparently healthy subjects and without a universally accepted consensus regarding the definition of the "reference population". This study investigates a large cohort of individuals presenting to our hospital Emergency Department (ED) focusing on sex and age effects on the 99th %ile of hs-cTnT value distribution. Methods: the study includes a total of 1995 subjects (males and females) admitted for chest pain to the ED of Desio Hospital from July 2011 to April 2015. All these patients have been discharged with a final diagnosis of "non-specific chest pain" (Cod. 786.50 by International Classification of Disease) and had a serum creatinine concentration <1,5 mg/dL. To test if sex and age respectively influence basal hs-cTnT values (Elecys system, Roche Diagnostics) One-way ANOVA and linear regression analysis were performed. Estimation of 99th %iles was performed on different subgroups: by sex, M (n=1083), F (n=912) and by age (in years): A (18-39, n=502); B (40-49, n=423); C (50-59, n=324); D (60-69, n=311); E (70-79, n=288); F (over 80, n=147). Results: sex does not influence hs-cTnT values while there is a positive significant relationship between basal hs-cTnT values and age. 99th %iles of hs-cTnT expressed in ng/L are: 15,97 (12,37-18,00) for group A; 25,56 for group B; 30 for group C; 27,64 for group D; 44,40 for group E; 90,80 for group F. There is no significant difference between groups B, C and D, thus we consider groups B, C and D as one single group for which 99th %ile is 29,00. Conclusions: in a population of subjects presenting to ED with non-specific chest pain age positively correlates with basal hs-cTnT values, therefore 99th %ile, used as a decision level in the AMI diagnostic workup, should be differentiated for age, accordingly: age <40: 16 ng/L; 40-69: 29 ng/L; 70-79: 44 ng/L; and age ≥80: 91 ng/L.

P167

EVALUATION OF cTnI e cTnT KINETICS IN PATIENTS ADMITTED TO EMERGENCY DEPARTMENT WITH THORACIC PAIN OR SUPRAVENTRICULAR TACHYCARDIA

S. Masotti¹, P. Buzzi², M. Franzini³, M. Santoro², I. Casagrande², R. Boverio², G.L. Guido², S. Ferillo², C. Prontera⁴, A. Clerico¹

¹Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Dipartimento di Emergenza, Ospedale Civile Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria

³Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa

⁴Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa

Background: In order to evaluate the kinetics and clinical relevance of cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT), we enrolled 36 patients (9 F and 27 M, age range 18-80 years) admitted to emergency department (ED) presenting thoracic pain within 6 hours before admission or supraventricular tachycardia.

Methods: Electrocardiographic and cardiac biomarker (cTnI, cTnT and NT-proBNP) evaluations were performed at the admission and then after 3, 6, 12 and 24 hours. We evaluated 4 different methods for cTnI assay: STAT Architect high Sensitive TnI (Abbott Diagnostics), ADVIA Centaur Troponin I Ultra (Siemens Healthcare Diagnostics), ST AIA-Pack cTnI third generation (Tosoh Bioscience), ACCESS AccuTnI+3 (Beckman Coulter Diagnostics). cTnT and NT-proBNP were measured with the ECLIA method using the Cobas E411 platform (Roche Diagnostics).

Results: cTnI concentrations, measured with different methods, showed very close correlations (correlations coefficient R ranging from 0,901 to 0,994). In patients with the final diagnosis of myocardial infarction, all the assay methods showed similar kinetics for cTnI concentrations with a peak at about 12 hours after the admission to ED. Moreover, when cTnI e cTnT were normalized for the respective cutoff values, the peak increment resulted higher for cTnI assays (and especially for the high sensitive methods) compared to the cTnT method.

Conclusions: In conclusions, the most popular cTnI immunoassays commercially available in Italy currently show very large systematic differences up to 2.5 folds between methods. As a result, clinicians should give great care to compare results obtained by different laboratories, especially when different methods are used.

Casagrande I, Cavazza M, Clerico A, et al. Proposal for the use in emergency departments of cardiac troponins measured with the latest generation methods in patients with suspected acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation. Clin Chem Lab Med 2013;51:1727-37.

P168

ANALYTICAL EVALUATION AND CLINICAL RESULTS OF A CHEMILUMINESCENT MICROPARTICLE IMMUNOASSAY (CMIA) FOR GALECTIN-3 WITH ARCHITECT PLATFORM

C. Prontera¹, M.C. Rizzo¹, S. Masotti², G. Vergaro², C. Passino², A. Barison¹, A. Del Franco¹, M. Emdin², A. Clerico²

¹Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Biomarkers for myocardial fibrosis have been included in the most recent North American cardiology guidelines, issued in 2013. The purpose of this study was to evaluate the analytical performance of an assay method for Galectin-3 (GAL-3), a fibrosis biomarker, by a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) on the Abbott ARCHITECT platform. We also evaluated the clinical results obtained by this assay on a large cohort of patients with heart failure (HF), in comparison with a control group of apparently healthy adult subjects. The data from this study confirm the excellent analytical reproducibility (CV <7% at low normal range level) and the high sensitivity of the candidate method. In detail, levels of GAL-3 above the LOD and LOQ (2 ng/mL) of the ARCHITECT assay have been recorded in all healthy and diseased subjects. Among 87 healthy subjects the mean GAL-3 levels ranged between 8.4 and 59.9 ng/mL, with a mean of 15.1 ng/mL, a SD of 7.3 ng/mL, a median of 13.6 ng/mL, and a 95th percentile of 26.4 ng/mL. No significant gender-related differences were observed, but a positive correlation with age (p=0.0375) was found. GAL-3 levels were significantly increased in HF patients with a more severe disease (NYHA classes III; n= 53, 21.8±16.8 ng/L) compared to both healthy subjects (n=87; 15.1±7.3 ng/mL, p=0.0006) and HF patients belonging to NYHA classes I-II (n=224; 15.9±7.3 ng/L, p=0.0006). Lastly, GAL-3 levels were significantly higher (p <0.0001) in 29 patients with amyloidosis than in healthy subjects and HF patients. Our data demonstrate the suitability of the ARCHITECT CMIA assay in clinical practice to measure circulating GAL-3 levels as a cardiac fibrosis biomarker in order to allow a stratification of cardiovascular risk as suggested by recent international guidelines.

Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2013;62:e147-239.

P169

RICERCA STATO MUTAZIONALE GENE EGFR SU PLASMA: CASO CLINICO

C. De Rosa¹, M. Vitiritti¹, M. Miraglia¹, B. Mancuso¹, F. Fimognari², S. Palazzo³, S. Vaccarella¹

¹UOC Laboratorio Analisi Cliniche, Biomolecolari e Genetica, A.O. di Cosenza

²U.O.C. Geriatria, A.O. di Cosenza

³U.O.C. Oncologia Medica, A.O. di Cosenza

Questo è il caso di una paziente di 77 anni giunta al P.S. dell'A.O. di Cosenza per dispnea e astenia. Gli esami di laboratorio evidenziano uno stato anemico con Hb 6.8, RX toracica con opacamento massivo emitorace dx e sospette lesioni nodulari multiple di natura ripetitiva. La paziente viene ricoverata nell' U.O.C di Geriatria per dispnea con insufficienza respiratoria da versamento pleurico massivo dx. Nel corso della degenza vengono eseguite emotrasfusioni; TAC Body che conferma l'RX torace, la presenza di formazioni micro e macronodulari con grossolane masse solide riferibili a secondarismi multipli ed epatomegalia con formazioni centimetriche ipodense etichettate all'esame ecografico come cisti. Al fine di individuare la neoplasia primitiva sono stati eseguiti: dosaggio dei marcatori tumorali (CA 15.3=131,80), mammografia (negativa per lesioni eteroplasiche), esame citologico liquido pleurico (reperto emorragico), biopsia endobronchiale dx (reperto: mucose edematose con flogosi aspecifica), ricerca sangue occulto nelle feci (negativo). Alla valutazione oncologica la paziente è risultata non idonea alla chemioterapia ma candidabile a trattamento biologico con Ab Anti-EGFR in caso di presenza di mutazioni del gene EGFR. Quest'ultimo è un recettore del fattore di crescita epidermico, coinvolto nella formazione e nello sviluppo del tumore polmonare non a piccole cellule, che può essere bersaglio d'azione di nuovi farmaci molecolari. Poiché il tessuto biotipico polmonare all'esame istologico è risultato privo di cellule neoplastiche non è stato possibile eseguire la ricerca di mutazioni di EGFR su tessuto, quindi su richiesta dell'oncologo è stata eseguita su plasma, utilizzando il kit Therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Real Time, che ha evidenziato una mutazione a carico dell'esone 19 del gene EGFR. Pertanto in base al risultato ottenuto in questo caso, in assenza di materiale biotipico idoneo all'analisi mutazionale di EGFR, si potrebbe proporre di eseguire la ricerca su plasma per permettere anche a questi pazienti di essere sottoposti a terapia biologica in presenza di mutazioni del gene EGFR. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-81.

P170

HIGHER LEVELS OF ADMA IN PATIENTS WITH G6PD DEFICIENCY

A. Baralla, D. Arru, S. Assaretti, D. Cambedda, S. Ena, G. Pira, E. Pisanu, E. Sotgiu, A. Zinellu, C. Carru

Dept. of Biomedical Sciences; Control Quality Unit - University Hospital of Sassari (AOUSS)

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) as well as monomethylarginine (MMA) are endogenous methylated aminoacids. ADMA and MMA are inhibitors of all Nitric Oxide (NO) isoforms and modulators of its synthesis. ADMA, SDMA and MMA appear in the cytoplasm after proteolysis of proteins containing the methylated arginine. Increased levels of ADMA have been shown to be one of the strongest risk predictor of cardiovascular events. Several studies demonstrate that ADMA concentration varies in response to different oxidative stress circumstances. G6PD is the major producer of NADPH in the cytoplasm, which is required by cellular antioxidant systems to reduce reactive oxygen species (ROS). Thus, G6PD deficient cells are sensitive to oxidizing stimuli and have a lower protection against oxidative damage. The objective of this work was to evaluate the plasma levels of Arginine, ADMA and SDMA in patients with G6PD deficiency. Arginine and dimethylated arginines were determined using a field-amplified sample injection capillary electrophoresis method with UV detection [1]. The people enrolled were 224(111 G6PD deficient and 113controls). Of the three methylated arginines only ADMA gave a significant difference ($p=0.008$) between the two groups, with higher values in the G6PD deficient group (median=0.382 and 0.405 μM respectively) while no difference have been observed in Arginine, SDMA and ADMA/Arginine (47.37 μM vs 48.21 μM , 0.343 μM vs 0.345 μM , 0.008 μM vs 0.008 μM , controls vs G6PD deficient people respectively). PRMTs and DDAH, the enzymes responsible for ADMA production and degradation are redox-sensitive, leading to increased ADMA production and decreased ADMA degradation under increased oxidative stress conditions. The higher oxidative stress status in people with G6PD deficiency can likely explain the increase of ADMA, but further investigations will be needed in order to gain insight into the molecular mechanisms involved in ADMA production in G6PD deficiency and in the implication of ADMA increase in cardiovascular diseases risk of these subjects.

1. Zinellu A, Sotgia S, Usai MF, et al. Improved method for plasma ADMA, SDMA, and arginine quantification by field-amplified sample injection capillary electrophoresis UV detection; *Anal Bioanal Chem* 2011;399:1815-21.

P171

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DEI MARKERS DI STRESS OSSIDATIVO IN SOGGETTI SARDI G6PD CARENTI

D. Cambedda, D. Arru, S. Assaretti, A. Baralla, G. Pira, E. Pisanu, E. Sotgiu, B. Scanu, C. Carru, A. Zinellu

Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari - Servizio Controllo di Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari (AOUSS)

È noto come l'esposizione di cellule, tessuti e organismi a radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno provochi gravi modificazioni del metabolismo, della struttura e del funzionamento cellulare.

I prodotti delle reazioni di ossidazione cellulare provocano perossidazione lipidica, con degradazione delle membrane plasmatiche e formazione di idroperossidi lipidici, la cui rottura produce una serie di aldeidi biologicamente attive tra cui la Malondialdeide (MDA). L'organismo è in grado di opporsi all'aumento dello stress ossidativo grazie ad una serie di molecole con proprietà antiossidanti tra cui la Paraoxonasi-1 (PON), il Glutazione (GSH) e i gruppi -SH delle proteine (PSH). Data l'importanza di queste molecole nell'insorgenza di malattie cardiovascolari si sono analizzati i loro livelli plasmatici in una popolazione di 224 pazienti sardi di sesso maschile, di cui 110 G6PD carenti (I) e 114 controlli (II).

I dosaggi sono stati effettuati con analisi spettrofotometriche ed in elettroforesi capillare. I risultati hanno evidenziato per l'MDA un aumento significativo dello stress ossidativo nei controlli (mediana =3,6 µmol/L; 1,5-8,1 µmol/L) rispetto ai pazienti (mediana =3 µmol/L; 1,3-6,7 µmol/L), P=0,0005. Nessuna differenza è stata osservata nei valori di PON tra i due gruppi (Mediana I=210 U/L, 71-604 U/L; Mediana II=223 U/L, 11-604 U/L, P=0,89). In accordo con la letteratura valori di GSH risultano più bassi nei pazienti (Mediana=547 µmol/L; 242-1067 µmol/L) che nei controlli (Mediana =918 µmol/L; 312-1832 µmol/L), P <0,0001. Un trend simile è stato osservato anche nei PSH presentano inferiori nei pazienti (6,2 ± 0,98 µmol/g Prot) rispetto ai controlli (5,9±0,81 µmol/gProt) P=0,028.

In conclusione, i soggetti G6PD carenti mostrano minori livelli di GSH ed una riduzione dei gruppi SH delle proteine, in accordo col fatto che la G6PD carenza li espone a un maggiore stress ossidativo [1]. Il dato in controtendenza della MDA potrebbe essere dovuto alla riduzione in questi soggetti del substrato di partenza per la perossidazione lipidica (colesterolo totale e di globuli rossi).

1. Hecker PA, Leopold JA, Gupte SA, et al. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304:H491-500.

P172

VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE ANALITICA DEL METODO DI ULTIMA GENERAZIONE BECKMAN COULTER ACCUTNI+3 PER LA DETERMINAZIONE DELLA TROPONINA CARDIACA I CON DXI 800

S. Storti, E. Battipaglia, V. Zanetti, R. Lombardi, A. Andrenelli, A. Baroni, D. Chicchi, M.S. Parri, C. Prontera, A. Clerico

Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa e Massa

Background: AccuTni+3 Beckman Coulter è un sistema in chemiluminescenza per la misura della Troponina I cardiaca (cTnI).

Scopo: valutare la performance analitica del metodo AccuTni+3 su Dxl 800.

Risultati: Sensibilità analitica: I limiti del bianco (LoB) e di rivelazione (LoD) sono stati calcolati secondo il protocollo CLSI EPI17-A. Il cal. 0 misurato 57 volte con lotti diversi di reagente ha dato un RLU medio di 12944,65 con SD 676,20. Il LoB è stato calcolato dal valore RLU medio del cal 0 + 1,645 SD. Quindi, il risultato della somma tra 1,645 SD + RLU medio del cal. 0 (valore ottenuto 1112,349 RLU) è stato interpolato nel punto con cTnI=0 (13292,366 RLU) della curva di calibrazione media (ottenuta con n=244, 0<cTnI<90 ng/L). Il LoD è stato così calcolato: LoB+1,645 SD, con SD=3,88 ng/L (ottenuta dalle misure di un pool di plasma con cTnI=10 ng/L).

Riproducibilità: in accordo con il protocollo CLSI EP5-A2 per 20 giorni consecutivi sono stati testati 2 pool di campioni plasma eparinato (pool A=26,5 ng/L e pool B=69,1 ng/L).

Profilo di Imprecisione: sono state fatte misure ripetute di cTnI in 8 pool di plasma (cTnI media tra 13.5 e 69.1 ng/L). Test di diluizione: Sono state misurate diluizioni seriali con soluzione fisiologica fino a 1:256 di 2 campioni con 300000<cTnI<400000 ng/L e di 3 campioni tra 5000 e 10000 ng/L, ottenendo per campioni a concentrazione più elevata un CV medio di 7.9%, mentre per campioni a concentrazione inferiore un CV medio di 6.6%(R2 0.999). Un campione con cTnI di 350000 ng/L è stato serialmente diluito con siero con cTnI<10 ng/L (R2= 0.999, CV medio 9,9%).

Conclusioni: I valori di LoB e LoD calcolati sono risultati rispettivamente 4.5 e 10.9 ng/L, il limite di quantificazione (LOQ) è risultato 17.1 (con CV 20%) e 30.4 ng/L (con CV 10%) (corrispondenti a quanto riportato dalla ditta). In accordo con i criteri proposti da alcuni linee guida, il dosaggio AccuTni+3 dovrebbe essere definito come un metodo di dosaggio clinicamente accettabile con una sensibilità contemporanea (contemporary sensitive).

P173

INTRODUZIONE DELLA TROPONINA T AD ALTA SENSIBILITA' (CTNT-HS): LA NOSTRA ESPERIENZA DI FAMILIARIZZAZIONE CON IL NUOVO MARCATORE

B. Trezzi², V. Rizza¹, M.G. Alessio¹, L. Paterna¹, F. Lavarda¹

¹Lab. di Chimica Clinica e di Ematologia, A.O. Osp. San Carlo Borromeo, Milano

²U.O. di Nefrologia e Dialisi, A.O. Osp. San Carlo Borromeo, Milano

Introduzione e scopo: Una diagnosi precoce di infarto miocardico acuto (IMA) è cruciale per poter instaurare una terapia medica efficace per il paziente. Da circa un anno, presso il laboratorio di urgenza del nostro Ospedale è stata sostituita la determinazione di troponina I (cTnI) con quella di troponina T ad alta sensibilità (cTnThs). Aderendo alle nuove raccomandazioni della letteratura, sono state variate le unità di misura, passando da ng/mL a ng/L ed essendo i valori della cTnThs non correlabili con i valori del marcatore precedente abbiamo programmato con i clinici un periodo di familiarizzazione con il nuovo marcatore, al fine di rendere il passaggio dal vecchio al nuovo metodo più semplice. Scopo del presente lavoro è stato analizzare le richieste di troponina giunte al nostro laboratorio, al fine di evidenziare e cercare di risolvere eventuali criticità legate alla nuova metodica.

Metodi: Statistica descrittiva di 1197 pazienti con richiesta di determinazione di cTnT-hs pervenute in laboratorio.

Risultati: Le determinazioni di troponina sono state 2459. Il numero medio di determinazioni per paziente è risultato 2.24. La distribuzione del numero delle determinazioni per richiesta ha evidenziato un valore al 95° percentile di 6 con un massimo di 22 determinazioni. Dei totali 1197 pazienti, 525 (44%) hanno avuto risultato inferiore al cut-off di 14 ng/L di cui il 34% con una sola determinazione e il 15% con due o più determinazioni. I restanti 672 pazienti (56%) hanno avuto risultato superiore al cut-off così distribuiti: il 19% con una sola determinazione ed il 32% con due o più determinazioni. Di tutti i pazienti, 115 (10%) hanno avuto due o più determinazioni, con una cinetica di incremento della cTnThs suggestiva di infarto miocardico.

Conclusioni: L'elevato numero di pazienti con cTnThs positiva (41%) senza una cinetica suggestiva di infarto conferma l'elevata sensibilità e la bassa specificità di questa troponina. Il risultato era atteso anche in relazione alle modalità di richiesta del marcatore per il periodo iniziale di familiarizzazione. I dati confermano come l'appropriatezza della richiesta del marcatore sia importate per il suo corretto utilizzo.

Apple FS, Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. Clin Chem 2012;58:54-61.

P174

EFFECTS OF LEFT VENTRICULAR ASSIST DEVICE SUPPORT ON BIOMARKERS OF CARDIOVASCULAR STRESS, FIBROSIS, DAMAGE, AND INFLAMMATION IN A GROUP OF PEDIATRIC PATIENTS WITH HEART FAILURE

R. Ragusa¹, C. Prontera⁴, A. Di Molfetta³, M. Cabiati², A. D'Amico¹, S. Storti⁵, M. Cantinotti⁵, G. Federico⁶, S. Del Ry², A. Amodeo³, M.G. Trivella², A. Clerico⁴, C. Caselli²

¹Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²CNR-Institute of Clinical Physiology, Pisa

³Department of Cardiothoracic surgery, Ospedale Bambino Gesù, Rome

⁴Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa

⁵Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Massa

⁶U.O. Pediatria Universitaria, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

Background: Ventricular assist device (VAD) utilization is increasing in children with heart failure (HF) unresponsive to medical therapy allowing for bridge to transplantation. Circulating biomarkers have an important role in the diagnosis and prognosis of HF in adults, with early indications for their use in pediatric population. Only few data are available about changes in markers of myocardial stress, fibrosis, damage, and inflammation in this setting. Purpose: The aim of this study was to evaluate changes in a panel of plasma biomarkers in pediatric patients with HF following VAD support.

Methods: N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), galectin 3 (Gal3), high-sensitivity Troponin I (hs-TnI), and ST2 levels were measured in frozen plasma collected from 9 pediatric patients submitted to VAD implant [56±27 (mean±SD) months, 5 males, 14±7 LVEF%, Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS) profiles 1/2]. Indications for support was idiopathic dilated (7 patients) and non compaction cardiomyopathy (2 patients). A group of 20 out of 90 healthy age- and sex-matched children were used as controls. Biomarkers were measured before and at 4 hrs, 1, 3, 7, 14 and 30 days after LVAD implant. Results: Before VAD implant, HF patients showed higher levels of each biomarker compared to healthy children [NT-proBNP: HF 8.9±0.3 pg/mL, healthy 4.6±0.2 pg/mL; hs-TnI: HF 3.7±0.8 pg/mL, healthy 1.9±0.2 pg/mL; ST2: HF 4.2±0.6 ng/mL, healthy 2.9±0.1 ng/mL; p <0.005], except for Gal3. During time course after VAD implant, biomarkers increased up to one day [hs-TnI: 1 day 8.9±0.77 pg/mL; ST2: 1d 6.9±0.31 ng/mL; pre-implant vs. 1 day p <0.001] and decreased up to pre-VAD values in 1 month. Only NT-proBNP showed significantly lower levels at 1 month than at pre-implant [NT-proBNP: 1 month 7.8±0.37 pg/mL; pre-implant vs. 1m p <0.05].

Conclusion: The biomarker profile of HF children was abnormal and was modified after VAD implant. Among biomarkers, NT-proBNP levels improved after one month, underlining the good interaction between implanted children and VAD. The different pattern of the other measured biomarkers need further evaluation.

P175

AUTOMATED PROCESSING OF SALIVA SAMPLES FOR CORTISOL AND CORTISONE QUANTIFICATION BY LC-MS/MS IN ROUTINE PRACTICEG. Antonelli¹, C. Artusi², M. Marinova², L. Brugnolo², M. Zaninotto², M. Plebani¹¹Dip. di Medicina, Università degli Studi di Padova²UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

Introduction: Late-night salivary cortisol (sF) is recommended as a frontline test for the diagnosis of Cushing's syndrome and the simultaneously measurement of cortisone (sE) can provide additional information about 11 β -HSD2 activity. LC-MS/MS is an efficient technology for routine determination of steroids due to its high specificity and sensitivity: time-consuming manual sample preparation remains a significant limitation of this technique.

Aim of the present study was to develop an automated sample-preparation protocol for quantification of sF and sE by LC-MS/MS using a commercially available liquid handling platform (Tecan Freedom EVO 100).

Methods: Six-level calibrators for F (0.5-51.0 nmol/L) and E (0.5-55.4 nmol/L) were used for the assay development, while two internal quality control home-made were used. Addition of internal standard solution to saliva samples (300 μ L) and SPE on HLB μ -elution 96-well plate are performed by liquid handling platform. After extraction done using vacuum block Te-VacS, the eluates (200 μ L) are submitted to on-line SPE, using column switching prior to LC-MS/MS analysis. The manual steps within the entire process are only two: the transfer of saliva samples from salivette tubes in tubes suitable for the liquid handling platform and the transfer of the collection plate to the HPLC autosampler. Using appropriate gradient elution profile, a total run time is 6 minutes. Transference of the reference intervals from the manual to the automated procedure was established by Deming Regression on 124 saliva samples analysed simultaneously with the two procedures.

Results: Calibration curves were linear throughout the selected ranges. The limit of quantification (0.5 nmol/L), the imprecision (CV<10%), the trueness (recovery: 95-119%) for both analytes were highly satisfactory. No significant constant and proportional bias were observed for sF and sE between the manual and the automated preparation.

Conclusions: The developed automated method for sample preparation minimizes the risk of mistakes by the substantial reduced manual workload and demonstrates suitable analytical performances for the sF and sE quantification in a routine clinical laboratory.

P176

MULTI-ANALYTE DETERMINATION OF THE DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS IN HUMAN PLASMA USING TANDEM MASS SPECTROMETRYA. Casarotti¹, C. Artusi¹, M. Marinova¹, L. Brugnolo¹, G. Antonelli², M. Zaninotto¹, M. Plebani¹¹U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova

Background: Direct oral anticoagulants (DOACs) are widely used for prophylaxis and treatment of thromboembolic events. Fixed doses are recommended, but dose individualization may be warranted in various clinical circumstances as renal impairment, elderly patients and obesity, because of an increased inter-individual variability and/or a modified bioavailability. Specific antidotes to reverse the anticoagulant effects of DOACs in the events of overdose are still under development and not yet approved for clinical use. To quantify DOACs in plasma, various dedicated coagulation assays are available.

Objective: To develop and validate a reference HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of Apixaban, Rivaroxaban and Dabigatran in human plasma.

Methods: 100 μ L of plasma samples, calibrators, and quality controls (Hyphen Biomed) were extracted with 400 μ L of internal standard solution (50 μ g/L of each stable-isotope-labeled analogues in acetonitrile). Separation was achieved using a C18 column and a gradient elution within a run time of 4.0 min. Positive electrospray ionization was used and ion transitions monitored by a triple quadrupole mass spectrometer TQD (Waters). The validation protocol was according guidelines proposed by Food and Drug Administration and European Medicines Agency.

Results: For all analytes, linearity were demonstrated over the concentration range of 1-500 μ g/L ($r_2 > 0.994$, $n=10$) with LLOQs amounting to 1 μ g/L. Results for intra- and inter-day precision (range CV% 1.8 to 10.1) and trueness (range bias% -3.6 to 10.1), obtained using four certified quality control materials, were within the guidelines acceptance criteria of $\pm 15\%$. Matrix effects were fully compensated by co-eluting stable-isotope-labeled internal standards. The method proposed allows an average workflow of about 8 samples/h, with total run time of 7 min, in which was included also the time that the system employed for reconditioning.

Conclusions: The findings made by us indicate that the proposed method is of value, since it is straightforward, precise and accurate. This method was successfully applied to 25 blood samples obtained from patients under DOACs treatment with a good agreement respect to dedicated coagulation assay ($r=0.999$).

P177

SPHINGOLIPIDS AND PHOSPHOLIPIDS PROFILING IN SERUM AND CSF OF DEMENTIA PATIENTS

E. Torretta¹, B. Arosio², C. Fania¹, M. Casati⁴, M. Vasso³, C. Gussago⁵, E. Ferri⁵, D. Mari², C. Gelfi¹

¹Dept. of Biomedical Sciences for Health, Univ. of Milan, Segrate (MI); IRCCS Policlinico San Donato, San Donato Milanese (MI)

²Geriatric Unit, Fondazione Ca' Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; Dept. of Medical Sciences and Community Health, Univ. of Milan, Milan

³Institute of Molecular Bioimaging and Physiology (IBFM)-CNR, Segrate (MI)

⁴Geriatric Unit, Fondazione Ca' Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan

⁵Dept. of Medical Sciences and Community Health, Univ. of Milan, Milan

Objectives: The diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is currently based on a time consuming and expensive combination of cognitive tests, brain imaging and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers. However, cumulative information is mandatory to discriminate AD from others dementias as the idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH). Recently, an altered sphingolipid metabolism, contributing to AD neuropathology, and a set of phospholipids, in blood of cognitively normal seniors, have been proposed as early predictor of memory impairment (1). Therefore, the analysis of sphingolipids and phospholipids offers a potential for lipid biomarker discovery in neurological diseases. The objective of the present effort is to apply MALDI profiling and HPTLC-MALDI to the study of sphingolipids and phospholipids profiles in CSF and serum samples, to assess MALDI specific lipid profiles useful for biomarkers research in dementias in an easy and high-throughput mode, alternative to LC-ESI-MS mass spectrometry. The latter is characterized by a great sensitivity but long acquisition times.

Methods: Total lipids from CSF and serum samples (AD n=10; iNPH=10; controls=10) were extracted according to Bligh and Dyer modified methods and organic phases were analyzed by MALDI profiling and HPTLC-MALDI. Statistics (Wilcoxon test $p < 0.01$, ROC AUC > 0.800) were performed by ClinProTools and Survey Viewer software. Peaks were identified by MALDI MS/MS and NIST software.

Results: Results indicate that MALDI Profiling was able to discriminate iNPH and AD patients. In CSF, 6 best separating peaks in the range 400-2000 m/z were identified. Furthermore, correlations between amyloid- β (A β) levels and lipid signals show a relationship between the accumulation of A β in neurological disorders and the amount of lipids. Beyond the ability to differentiate iNPH and AD patients by providing a deeper characterization of sphingolipids and phospholipids composition, HPTLC-MALDI was able to identify several species with similar m/z range and similar retention factor on the HPTLC plate, suggesting this technology as a potential new approach for lipid biomarkers search in neurological diseases.

1. Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca MS, et al. Nat Med 2014;20:415-8.

P178

MALDI-TOF/MS PROTEOMIC SIGNATURE OF PRE-ANALYTICAL SAMPLE QUALITY

A. Padoan¹, D. Basso¹, M. La Malfa¹, A. Di Chiara², G. Pavanello², M. Plebani¹

¹Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Italy

²SIPRES, Gruppo Pavanello, Padova, Italy

Background and Aims: Pre-analytical issues represent a critical aspect for proteomic biomarker discovery studies. Pre-analytical processing (sample types, centrifugations, temperatures and storage duration) was studied to identify MALDI-TOF/MS signatures of sample quality.

Methods: 400 mL blood was collected in serum, EDTA and citrate tubes from one donor. Tubes were kept at room temperature (RT) or refrigerated (CT). After 30 minutes (baseline), 3 hours (hrs), 6 hrs and 9 hrs, samples were centrifuged once (1200 g, 10 minutes) or twice (2500 g, 15 minutes). 100 μ L of each sample were precipitated by ACN (1:1v/v). Peptides were dried, resuspended in 0.1%TFA, ZipTip desalted and analysed at MALDI-TOF/MS. Spectra were processed by mMass; relative intensities (RI) were used to normalize signals. For each anticoagulant and storage condition, the most abundant features were evaluated at each time-point. For the most variable features, their baseline RIs were compared to those obtained after 9hrs of storage.

Results: Features in citrate tubes did not significantly varied. At RT, EDTA tubes centrifuged once, the feature at m/z 1896 showed a RI increase over storage time (from 80% to 120%). In serum tubes, RT storage showed a decreasing trend of the m/z 1206 and 1350 features. By comparing the most variable features at baseline with respect to 9 hrs storage, no significant differences were found in EDTA tubes; in serum tubes, the feature at m/z 2021 dramatically increased after 9 hrs of storage at RT (50 and 200 fold-increase, for 1 or 2 centrifugations, respectively). A lower increase was observed at CT conditions (10 and 20 fold-increase, for 1 or 2 centrifugation, respectively).

Conclusions: EDTA and citrate plasma seem to be less influenced by storage conditions. MALDI-TOF/MS features at m/z 1206, 1350 and 2021 could be indicators of serum specimen quality, especially when RT storage is adopted.

Bell AW, Deutsch EW, Au CE, et al. A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. Nat Methods 2009;6:423-30.

Founding: BestAgeing, FP7 Cooperation Work Program: HEALTH.2012.2.1.1-2.

P179

IMPLEMENTATION OF FAECAL CALPROTECTIN VALIDATION

R. Rizza, D. Scribano, C. Zuppi, T. De Michele

Dipartimento di Diagnostica e Medicina di Laboratorio Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Background: Faecal calprotectin (FC) has been proposed as a useful and non-invasive marker of acute intestinal inflammations, even if the widespread use might not be appropriate for the low prevalence of patients with IBD (inflammatory bowel diseases) among all patients attending a general practitioner with gastrointestinal symptoms.

Objective: for improvement of FC validation, we introduced a questionnaire for outpatients with questions related to the diagnosed diseases, complained possible symptoms and current drug therapy, since the quality data is mainly due to pre-analytical phase (extraction faeces sample and its features).

Patients and methods: 168 FC samples were assessed by device Smart Prep Device (Roche) and detected by fluorescence enzyme immunoassay (FEIA) on Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific). The enrolled patients, according to reported informations by themselves, consisted of: 32 with known ulcerative colitis (UC), 29 with known Crohn's disease (CD) and 69 with inflammatory bowel disease (IBS) and other diseases. Other patients (38) were excluded because of or missing informations or not suitable samples.

Results: Using the recommended cut-off (50mg/kg) and the questionnaire informations, we obtained a statistical significative correlation between FC and diagnosed IBD: UC $p < 0.03$ and CD $p < 0.01$. Further specificity, sensitivity, positive and negative predictive values (PPVs and NPVs) were calculated for respective UC and CD patients. UC: sensitivity 44% (95%CI from 26% to 62%), specificity 88% (95%CI from 78 to 95%), PPV 64% (95%CI from 41% to 83%), NPV 77% (95%CI from 66% to 86%). CD: sensitivity 62% (95%CI from 42% to 79%), specificity 88% (95%CI from 78 to 95%), PPV 69% (95%CI from 48% to 86%), NPV 85% (95%CI from 74% to 92%).

Conclusions: we believe that the introduced questionnaire may be helpful to improve the FC validation, because allows us to evaluate as the pre-analytical phase as the clinical data. The different obtained values of specificity, sensitivity, PPVs and NPVs respect to data literature, are due to our small group of patients and the negative FC results could be due to pharmacological remission and so we need confirmation from a larger population.

Smith LA, Gaya DR. World J Gastroenterol 2012;18:6782-9.

P180

A LC-MS/MS METHOD FOR THE EVALUATION OF INTESTINAL PERMEABILITY: PRELIMINARY DATA

A. Schiattarella, S. Persichilli, A. Primiano, R. Rizza, A. Cocci, C. Zuppi, G.M. Merone, J. Gervasoni

Dip. di Diagnostica e Medicina di laboratorio, Policlinico A. Gemelli, Roma

Background: The two most commonly used methods to measure intestinal permeability are the dual sugar tests and the ^{51}Cr -labeled ethylenediaminetetraacetic acid permeability test.

Radioisotope based test is time-consuming, expensive and reliability is influenced by different confounding factors. Thus, intestinal permeability has been measured by urinary excretion of two probes of different sizes but similar transit and uptake processes, and calculating the excretion ratio of a monosaccharide and a disaccharide such as mannitol and lactulose. Several enzymatic, colorimetric and chromatographic method have been developed for the determination of mannitol and lactulose. However most of them are time-consuming and do not permitted a simultaneous determination of both sugar. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry has been proposed to solve these problems.

Aim of this work is to develop a simple and rapid method for the simultaneous analysis of these compounds by LC-MS/MS. Methods: Calibration curves were prepared in water:acetonitrile 20:80. Raffinose was used as internal standard at 25 mg/L in water:acetonitrile 20:80. Samples were vortexed and centrifuged to remove the sediment, then 100 μL of urine sample (calibrator or control), was added to 300 μL of internal standard. 200 μL of the aliquot was transferred to a vial and placed in the autosampler for LC-MS/MS analysis.

The chromatographic separation was performed using a Phenomenex Luna NH_2 column operating at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ and eluted with a linear gradient from 20 to 80 water in acetonitrile. Total run time is of 9 minutes.

The mass spectrometry operates in electrospray negative mode. The triple quadrupole was set in selected reaction monitoring following the specific transition: 341.0>160.7, 341.0>100.9 for Lactulose; 181.0>162.7, 181.0>119.0, 181.0>89.0 for Mannitol; 503.1>340.7, 503.1>322.7, 503.1>221.0 for Raffinose.

Results: Linearity ranged from 10 to 200 mg/L for Lactulose and Mannitol. Recovery was higher than 90%. Total imprecision was lower than 15% for both analytes. The method was tested on 10 urinary samples and the matrix effect was negligible.

Conclusions: The presented method, rapid and sensitive, is suitable in a clinical laboratory for the measurement of the ratio L/M for determining intestinal permeability in clinical practice.

P180A

CELLULAR ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID AND SEROUS FLUID SAMPLES USING THE BODY FLUIDS APPLICATION OF THE SYSMEX XN SERIES AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER

S. Buoro¹, T. Mecca¹, M. Seghezzi¹, P. Dominoni¹, A. Crippa¹, C. Ottomano²

¹USC SMeL Generale di Base - Analisi chimico-cliniche, A.O. Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

²CAM-Laboratories, Monza, Italy

Background: Cellular analysis of Body Fluids [i.e. Ascitic (AF), Pleural (PF) and Cerebrospinal fluid (CSF)] is important for diagnosis and follow-up of several diseases. Modern hematology analyzers offer dedicated application for BF analysis, for fast and standardized results. In this study we evaluated the performances of the BF mode application of Sysmex XN analyzer (XN-BF) for Total Nucleated Cells count (TNC) in AF, PF and CSF samples according to CLSI document H56A (1) and ICSH guidelines (2).

Methods: For each BF type, Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantitation (LoQ) were assessed according to CLSI EP17A2. Carry Over (CO) and Linearity were assessed according to CLSI H56A and EP06A respectively. Comparability of TNC count between XN-BF and manual microscopy (OM, performed in a Nageotte counting chamber) was assessed in 99 AF and 45 PF samples collected in K₃EDTA and in 87 CSF samples collected in sterile tubes.

Results: CO was negligible, <0.1%. LoB was $0.7 \times 10^6/L$ for AF, PF, CSF. LoD was $2.1 \times 10^6/L$, $2.0 \times 10^6/L$ and $1.6 \times 10^6/L$ for AF, PF and CSF respectively. LoQ was $4.5 \times 10^6/L$ for AF and PF; $3.0 \times 10^6/L$ for CSF. Linearity was excellent ($r^2=1.0$) with negligible linearity deviation in the concentration range evaluated ($17-4427 \times 10^6/L$ for serous fluids; $6-787 \times 10^6/L$ for CSF). TNC counts on patient samples ranged from 54 to $7707 \times 10^6/L$ in AF, 11 to $7760 \times 10^6/L$ in PF and 0 to $3853 \times 10^6/L$ in CSF. Passing-Bablok regression analysis showed a good agreement between XN-BF and OM: $y=1.00x+5.53$ on AF; $y=0.99+8.92$ on PF; $y=1.12x+0.55$ on CSF. Bland-Altman analysis showed no significant differences between XN-BF and OM, with a mean bias (95% CI) of $23,1 \times 10^6/L$ (-18.9 to 65.2), $17.9 \times 10^6/L$ (-63.0 to -90.7), $7.2 \times 10^6/L$ (-19.4 to 33.8) on AF, PF and CSF respectively.

Conclusions: Our study shows that the XN-BF offers reliable results for cellular analysis in clinically relevant concentration ranges for CSF and serous fluids. It uses 88 μ l of sample even from close tube without any manual pretreatment allowing fast, safe and standardized analysis even in STAT or emergency situation.

1. Body fluid analysis for cellular composition; CLSI H56-A, 2006.
2. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids, 2014.

P180B

MULTICENTER EVALUATION OF DIAGNOSTIC PERFORMANCES OF THE SYSMEX XN-1000 BODY FLUID MODULE FOR WBC COUNT AND DIFFERENTIAL IN CEREBROSPINAL FLUID SAMPLES

S. Buoro¹, T. Mecca¹, M. Seghezzi¹, M. Lorubbio², T. Biagioli², B. Peruzzi², A. Fanelli², A. Crippa¹

¹Laboratorio Analisi Cliniche, AO Papa Giovanni XXIII, Bergamo

²Laboratorio Generale, AOU Careggi, Firenze

Background: Cerebrospinal Fluid (CSF) poses major challenges for automated cell analysis due to the limited accuracy of most hematology analyzers (HA) at low WBC concentrations of CSF samples [1]. The Sysmex XN-1000 is an HA with a specific module dedicated to body fluid analysis. In this study we evaluated the diagnostic accuracy of the XN-1000 in CSF samples in comparison to manual microscopy, joining the results obtained in two clinical laboratories.

Materials and methods: A total of 147 CSF samples (85 in Bergamo, 62 in Florence) were evaluated. Manual WBC counts were performed on a Nageotte chambers. Microscopy counting of WBC differential was performed on cytocentrifuged slides of 32 samples with adequate cellularity. The sum of "neutrophils, basophils, eosinophils" and of "lymphocytes, monocytes, macrophages" were compared respectively with the results of PMN and MN reported by Sysmex XN. Results were evaluated by Pearson's correlation (r value), Passing-Bablok regression, Bland Altman plot (Bias analysis) and ROC curve analysis for diagnostic agreement (Sensitivity, SE and Specificity, SP).

Results: A good agreement was found with no significant differences between the two methods ($r=0.97$; $y=1.09+0.56$; bias $8.1 \times 10^6/L$; 95%CI -5.7 to 21.8) in all samples evaluated with a WBC count ranging from 0 to $2142 \times 10^6/L$. Interestingly, the agreement improved in 109 samples with WBC counts $<150 \times 10^6/L$ ($r=0.97$; $y=1.00+0.70$; bias $1.0 \times 10^6/L$; 95%CI -0.1 to 2.1). No significant differences were observed also for PMN ($r=0.95$; $y=1.02+1.30$; bias $-8.3 \times 10^6/L$; 95%CI -46.2 to 29.7) and for MN ($r=0.87$; $y=1.21+0.12$; bias $10.4 \times 10^6/L$; 95%CI -21.3 to 42.1). 83 CSF samples (56.5%) had a positive manual WBC count ($>5.0 \times 10^6/L$). ROC curve showed an AUC of 0.98 (95%CI 0.96 to 1.00). At a cut-off of $5.0 \text{ WBC} \times 10^6/L$, SE and SP of XN-1000 was 0.98 and 0.89 respectively.

Conclusions: Our results show that the BF module of Sysmex XN-1000 has optimal performances for cellular analysis of CSF samples allowing accurate WBCs count and differential even in the lower concentration range, overcoming the limitations of automated cellular analysis in this diagnostic setting.

1. Sandhaus LM. Body Fluid Cell Counts by Automated Methods. Clin Lab Med 2015;35:93-103.

P181

A PROTOCOL FOR THE EVALUATION OF THE REAL VOLUME OF CELLS FROM A TISSUE BIOPSY FOR DETERMINING INTRACELLULAR DRUG CONCENTRATION: THE EXAMPLE OF TACROLIMUS

D. Pensi, A. Denicolò, F. Favata, C. Pisciotta, G. Di Perri, A. D'Avolio

Lab. Farmacologia Clinica e Farmacogenetica, Clinica Universitaria di Malattie Infettive di Torino, Dip. Scienze Mediche, Osp. Amedeo di Savoia, Torino, Italia

Intra-tissue drug concentrations are fundamental to evaluate drug efficacy and toxicity as well as for monitoring drug interactions and inter-subject variability in drug response. Blood or plasma drug concentrations are typically used as a surrogate measure for the ones at the site of action. Unfortunately, this is not valid for poorly permeable, actively transported and highly protein-bound drugs. For this reason, efficiently quantifying drugs at the real sites of action could be important. However, current methods for drugs intra-tissue quantification express results as "ng/mg of tissue", making these not comparable with plasma or blood concentrations. Conversely, in this study we aimed to develop a method to correctly normalize intra-tissue analytical results on the real volume of cells (as "ng/mL of cells"): Tacrolimus (TAC) was used as example.

Blank PBMCs for calibration curve were collected using Cell-Preparation-Tubes and counted with a Beckman Coulter Counter. Mice biopsies were washed with PBS and divided in portion of 10-20 mg. After Internal Standard (6,7-dimethyl-2,3-di(2-pyridyl)quinoxaline) and TAC addition, samples were homogenated into MagNA Lyser Green Beads by a MagNA Lyser Instrument (Roche): 200 μ l of supernatant underwent automated DNA extraction through MagNA Pure Compact (Roche). Cell number was quantified by evaluating DNA absorbance, comparing it to a calibration curve (PBMCs). Other 35 μ l of the homogenate were diluted with 465 μ l H₂O:MeOH [30:70] and TAC was quantified using a previously published UPLC-MS/MS coupled with on-line SPE method for its quantification in PBMCs (Pensi et al., 2015). From each biopsy, a part of tissue was used to evaluate tissue cells Mean Cellular Volume. This method resulted capable of quantifying TAC, expressing it as ng/mL. No significant differences between PBMC and tissue samples was observed in terms of matrix effect and recovery. This method was applied to different kinds of mouse tissue and it will be tested soon for its capability for several drugs quantification in human biopsies. Since this protocol allows to correctly normalize intracellular analytical results, it could be useful in the near future to verify the correlation between plasma/blood/PBMC and tissue concentrations for many drugs.

P182

PRIME VALUTAZIONI DEL NUOVO METODO ULTRASENSIBILE SU LIAISON XL PER IL DOSAGGIO DELLA PROCALCITONINA

A. Calcinari, M. Piaggese, F. Balducci, M. Brugia

Lab. Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona

Premesse e scopo dello studio: La Procalcitonina (PCT) si è imposta ormai da tempo nell'utilizzo clinico di routine per la gestione e l'ottimizzazione del trattamento delle infezioni batteriche. Il ruolo di questo biomarcatore, forte di un'evidenza scientifica ben consolidata, diventa sempre più fondamentale nell'approccio diagnostico-terapeutico della sepsi e delle infezioni di origine batterica. L'aumento della richiesta ha portato allo sviluppo di nuove metodologie automatizzate da integrare alla routine di laboratorio. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le performance analitiche di un nuovo test in chemiluminescenza su piattaforma analitica LIAISON XL. Materiali e metodi: Nel periodo 01/03/2015 al 01/06/2015 sono stati analizzati retrospettivamente 85 campioni di sangue, mantenuti congelati a -20 °C, di 73 pazienti (44 maschi, 29 femmine, età media 56,7 anni) ricoverati presso le varie Unità Operative dell'Azienda Ospedaliera di Ancona. La PCT è stata dosata mediante il metodo ELFA (Vidas- Biomerieux, sensibilità 0.05 ng/ml) e CLIA (Liaison XL DiaSorin, sensibilità 0.02 ng/ml) e confrontati i valori ottenuti. I cut-off utilizzati sono stati: PCT <0,5 ng/ml infiammazioni, infezioni locali clinicamente non significative; 0,5-2,5 ng/ml risposta infiammatoria moderata e/o altre condizioni (traumi gravi, chirurgia maggiore, ecc.), 2,6-10 ng/ml risposta infiammatoria sistemica grave; PCT >10 ng/ml sepsi batterica grave o shock settico.

Risultati e conclusioni: I valori di PCT ottenuti sono stati divisi in base ai cut-off sopraindicati.

7 campioni avevano PCT <0.05 ng/ml col VIDAS e un valore medio di 0.039 ng/ml con LIAISON. Nei 32 campioni con valori 0,05-2.5 ng/ml si è ottenuta una media di 0,66 \pm 0,70 ng/ml con VIDAS e di 0.77 \pm 0,80 ng/ml con LIAISON (R²=0,93). Nei 18 campioni con valori 2,6-10 ng/ml la media è di 5,9 \pm 1,79 ng/ml per il metodo di routine e 6,15 \pm 1,76 ng/ml con LIAISON (R²=0,94). Nei 23 campioni con PCT>10 ng/ml si è ottenuto un valore medio di 56.7 \pm 68,9 ng/ml con VIDAS e di 53,7 \pm 68,9 ng/ml con LIAISON (R²=0,98). I dati ottenuti mostrano una ottima sensibilità del nuovo metodo DiaSorin e una buona correlazione con il metodo utilizzato ora in laboratorio.

1. Fosse J, Cupa M, et al. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. Crit Care Med 2004;32:1166-9.

P183

DETERMINAZIONE DELLA PROCALCITONINA NEL SIERO DI PAZIENTI CON SOSPETTA SEPSI: CONFRONTO TRA METODI

V. Bianchi¹, t. Callegari¹, M. Casalecchi¹, E. Guazzotti¹, A. Lanati¹, M. Picollo¹, G. Tramuta¹, M. Vidali², R. Guaschino¹

¹S.C. Laboratorio Analisi, ASO Alessandria

²S.C. Medicina Trasfusionale, Ospedale degli Infermi, Biella

Introduzione: La Procalcitonina (PCT) si forma nelle cellule C dopo un processo proteolitico dalla calcitonina. Di norma la PCT circolante è bassa, l'aumento è correlato all'infezione e è quindi uno strumento nella diagnosi precoce di sepsi. Scopo del lavoro, condotto nell'ambito del progetto aziendale "SEPSI@AL.it, è valutare le performance analitiche di un nuovo kit rispetto ad uno presente da anni sul mercato.

Materiali e metodi: 113 d e 126 u, età: 1 mese-95 anni. Confronto kit routine (ADVIA Centaur –Brahms) versus nuovo kit (ADVIA 2400- Diazyme)

Risultati: Concentrazione di PCT con Brahms e Diazyme sono rispettivamente: mediana 0,41 ng/mL (IQR 0,19-1,69, min-max 0,06-30,98) e 0,56 ng/mL (IQR 0,35-1,75, min-max 0,01-40,07). L'analisi non parametrica di Passing-Bablok (XBrahms, YDiazyme) mostra una modesta intercetta significativa di 0,10 (95%IC 0,08-0,13) e un coefficiente di regressione non significativo di 0,96 (95% IC 0,90-1,01), ciò indica solo un minimo errore sistematico costante ma non proporzionale. L'analisi di Bland-Altman mostra un ridotto bias sistematico significativo di -0,23ng/ml (95%IC -0,36-(-)0,10), con 95% delle differenze (Brahms –Diazyme) fra -2,24 e 1,78.

La stessa analisi, limitata all'intervallo 0-2 ng/mL, evidenzia un bias di -0,18ng/mL (95%IC -0,27-(-)0,08) con 95% delle differenze fra -1,42 e 1,07 ng/ml.

L'accettabilità del nuovo kit è valutata con l'imprecisione combinata (ImprComb%) delle due metodiche (8,9% a 0,5 ng/ml; 8,5% a 2 ng/ml) e l'errore massimo ammissibile (20%). L'analisi con grafico MedX, che combina imprecisione e bias, evidenzia buone prestazioni analitiche a 2 ng/ml; tuttavia il nuovo kit è risultato critico per concentrazioni vicine a 0,5 ng/mL. D'altra parte i kit Brahms utilizzati su strumentazioni differenti mostrano criticità a questi valori (VEQ Randox). La concordanza tra i due kit, dopo trasformazione della concentrazione di PCT in 3 classi (<0,5; 0,5-2; >2 ng/ml) è risultata buona (coppie concordanti: 80%; k pesato: 0,75).

Conclusioni: I due metodi risultano sostanzialmente sovrapponibili per PCT >2 ng/mL. Tuttavia, lo studio ha evidenziato alcune discrepanze significative per PCT <2 ng/mL. D'altra parte i kit Brahms utilizzati su strumentazioni differenti mostrano criticità a questi valori (VEQ Randox)

P184

DETERMINAZIONE DELLA FERRITINA GLICOSILATA NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA MALATTIA DI STILL: OTTIMIZZAZIONE DELLA FASE PREANALITICA

A. Casarotti¹, M. Marinova¹, C. Artusi¹, L. Brugnolo¹, G. Antonelli², M. Zaninotto¹, M. Plebani¹

¹U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova

Introduzione: La diagnosi clinica della malattia di Still dell'adulto (AOSD) risulta difficile per la mancanza di marcatori biochimici specifici e per la presenza di quadri clinici comuni a numerose patologie. L'evidenza di elevate concentrazioni di ferritina totale (FT) associate a bassi livelli di ferritina glicosilata (FG <20%) ha permesso di integrare i criteri diagnostici più comunemente utilizzati (criteri di Yamaguchi), inserendo il dosaggio della FG come criterio maggiore (criteri di Fautrel). Il metodo utilizzato per la determinazione della FG si basa su un principio cromatografico descritto in letteratura (Worwood M et al., 1979) che permette la separazione tra FG e ferritina non-glicosilata (FNG) utilizzando la resina Concanavalina A (ConcA), con alcune modifiche riguardanti il volume del campione e il tempo di incubazione.

Obiettivi: Ottimizzare la modalità di preparazione dei campioni mediante l'utilizzo di colonnine di estrazione monouso che facilitano la successiva procedura di estrazione del campione in modo standardizzato.

Materiali e metodi. Per ogni campione, 100 µL di plasma vengono aggiunti a 600 µL di resina ConcA e 600 µL di Sepharose 4B (Sep 4B), rispettivamente, in colonnine di estrazione monouso. I campioni vengono incubati per 90 min a 25°C sull'agitatore rotante, centrifugati (2000 rpm per 1 min) e successivamente misurata la concentrazione di FT (resina Sep 4B) e FNG (resina ConcA) nel surnatante con metodo immuno-elettrochemiluminescente. Il valore percentuale di FG si ottiene per differenza. L'imprecisione del metodo è stata valutata utilizzando un pool di plasma da litio eparina di soggetti donatori (valore medio 62%) e uno di pazienti con diagnosi certa di AOSD (valore medio 14%).

Risultati: L'imprecisione intra-serie (CV% n=10) del pool negativo e positivo risultano <3% e <5%, rispettivamente, mentre quella inter-serie (CV% n=20) <9% e <15%. Con il metodo descritto sono stati valutati i campioni di 9 soggetti con sospetto di AOSD dal 2012 ad oggi. I valori ottenuti (range 9-20%) sono stati utilizzati per confermare la diagnosi.

Conclusioni: Le modifiche apportate nella fase preanalitica consentono di ottenere prestazioni analitiche idonee e rendono il metodo, benché indaginoso, più facilmente applicabile nella medicina di laboratorio.

P185

A HUMAN TROPONIN I DIAGNOSTIC KIT CROSS-REACTS WITH CULTURED CARDIOMYOCYTES AND HEART TISSUES DERIVED FROM OTHER MAMMALIAN SPECIES

E. Crescini¹, M. Del Barba², S. Bellintani², L. Caimi¹, P. Dell'Era¹, E. Garrafa¹

¹Dip. di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia, Brescia

²Lab. Analisi Chimico-Cliniche, A.O. Spedali Civili di Brescia, Brescia

Tissue injury leads to the disruption of cellular membrane integrity and loss of cytoplasmic components into the extracellular space. Myocardial damage results in elevated levels of cytosolic and structural proteins belonging to injured cells such as the wider expressed aspartate aminotransferase (AST) or the cardiac specific Troponin I (cTnI). The protein structure is highly conserved across species and the assays certified for human cTnI could represent a valuable tool to estimate cardiac suffering in animals [Vishal et al., 2012]. We collected post-mortem cardiac tissue from different animal species and we tested the cross reactivity of heart homogenates with a human cTnI sandwich immunoassay based on luminescent oxygen channeling (LOCI™) technology (Siemens Diagnostics). We identified a robust cross-reactivity of the kit with lysates derived from mouse, rat, pig, and horse heart tissues. In order to reproduce in vitro a model resembling cardiac ischemia/reperfusion injury (IRJ), we setup primary cultures of neonatal mouse hearts that were exposed to oxygen glucose deprivation (OGD) followed by reperfusion. Since cultures are mainly composed by fibroblasts and CMs, we were able to detect murine AST using an enzymatic activity assay as well as murine cTnI using the LOCI™ kit. We confirmed the specificity of cTnI dosage for CMs, at variance with AST that recognizes also fibroblasts, and we were able to correlate cTnI amount with CM number. Next, CMs were challenged in the IRJ model were, similarly to the evaluation of cardiac markers in circulating blood, released cTnI was directly estimated in culture supernatants. We were able to quantify CM damage and we also showed the protective effect of resveratrol in effectively inhibiting cTnI release. In conclusion we confirm the specificity and the sensitivity of cTnI quantification in identifying not only human but also mammalian CMs and we suggest the use of a high sensitivity cross-reactive diagnostic kit for an accurate evaluation. We are convinced that this finding will surely help in assessing hypothetical myocardial damage in mammals and in cellular cardiovascular-related models.

P186

CROSS REATTIVITA' PER OXCARBAZEPINA DI UN METODO PETINIA PER DOSAGGIO CARBAMAZEPINA

N. Lelli, C. Rota, T. Trenti

Lab. Tossicologia e Diagnostica Avanzata, Nuovo Osp. Civile S. Agostino Estense, Modena

Scopo del lavoro: Verificare la correlazione fra metodi immunometrici per dosaggio carbamazepina (CBZ) a seguito della sostituzione, imposta dalla ditta fornitrice (Abbott), di un metodo EMIT con altro metodo.

Materiali e metodi: 53 sieri per il confronto PETINIA (particle enhanced turbidimetric inhibition IA)– EMIT.

52 sieri per il confronto CMIA (Chemiluminescent Microparticle IA) – EMIT.

15 sieri per verifica cross reattività per MHD (monoidrossiderivato della oxcarbazepina OXC) dei metodi EMIT (Abbott 1E12-21), PETINIA (Abbott P05-21) e CMIA (Abbott 1P36)

Analizzatore Architect ci8200.

Metodo HPLC kit "ANTIEPILETTICI IN SIERO E PLASMA" (Chromsystems 22000/HR)

Risultati: Il CV del metodo PETINIA è del 3.55% e l'equazione di regressione ($y = 0,247312 + 0,989247 x$) mostra un'ottima correlazione con il metodo EMIT. Un campione, escluso dall'analisi in quanto discrepante (3.3 ug/ml con PETINIA e 0.6 ug/ml con EMIT) e analizzato in HPLC ha mostrato una elevata concentrazione di MHD..

Testati altri 14 campioni noti a varie concentrazioni di MHD coi metodi EMIT e PETINIA: dimostrata una cross reattività, concentrazione dipendente, per MHD del metodo PETINIA (irrilevante con il metodo EMIT).

Testato poi kit Abbott CMIA: verificati CV (2.8%) e correlazione con metodo EMIT ($y = 0,1560 + 0,8522 x$) mediante analisi di regressione.

Totale assenza di cross reattività per MHD sui medesimi 15 campioni già studiati con metodi EMIT e PETINIA.

Conclusioni: Lo studio comparativo tra metodi immunometrici per il dosaggio della CBZ ha dimostrato una ottima correlazione sia tra PETINIA e EMIT, che tra CMIA ed EMIT.

Il metodo PETINIA tuttavia ha rivelato una cross reattività, concentrazione dipendente, per MHD, del tutto assente con il metodo CMIA.

Essendo frequente la richiesta errata di dosaggio di CBZ in pazienti in terapia con OXC, è importante che il metodo per CBZ non abbia cross reattività per MHD. Infatti una elevata concentrazione di MHD potrebbe generare un'apparente bassa concentrazione di CBZ e indurre ad improprie modifiche della terapia.

McMillin GA, Johnson-Davis KL. Issue of interferences in Therapeutic Drug Monitoring. Cap. 13. In: Accurate results in the clinical laboratory, 1st ed. Elsevier, 2013.

P187

MINDRAY BC-6800 BODY FLUID MODE: CELL COUNT AND DIFFERENTIAL PERFORMANCES ON CEREBROSPINAL FLUID

M. Seghezzi, T. Mecca, A. La Gioia, A. Crippa, M. Vavassori, P. Dominoni, S. Buoro

USC SMeL generale di base - Analisi chimico-cliniche, A.O. Papa Giovanni XXIII, Bergamo

Background: A cerebrospinal fluid (CSF) cell count is a clinical laboratory test that provides important diagnostic information in various pathological conditions. High white blood cell (WBC) counts in CSF samples ($>5 \times 10^6/L$ in adults, $>7 \times 10^6/L$ in children, $>27 \times 10^6/L$ in neonates) are often observed in meningitis, encephalitis and other neurological disorders. BC-6800 is able to perform Body Fluid analysis in a dedicated module (BF). BC-6800-BF provides the following parameters: total nucleated cells (TC-BF), leukocytes (WBC-BF), polymorphonuclear (PMN# and %) and mononuclear cells (MN# and %). Aim of this study is to evaluate the application of BC-6800-BF in analysis of CSF, according to CLSI document H56-A (1).

Method: Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantitation (LoQ) were assessed according to CLSI document EP17-A2. Carry Over (CO) was assessed according to CLSI H56-A and Linearity was evaluated according to CLSI document EP06-A. Total cell count (TC) and differential of 81 CSF samples (range 0 to 3356×10^6 cells/L) collected in sterile tubes without additives were simultaneously assessed by BC-6800-BF and optical microscopy (OM) performed both in Nageotte chamber and cytospin. Diagnostic performance was evaluated with receiver operating characteristics (ROC) curves analysis. Statistical analysis was done with Analyse-it software version 3.80.

Results: TC-BF's LoB, LoD and LoQ were respectively of 0×10^6 cell/L, 3×10^6 cell/L, 3×10^6 cell/L, with an excellent Linearity ($r^2=1.0$), and a negligible CO. TC-BF and differential count in PMN and MN showed respectively: Pearson's correlation of 0.99, 0.84 and 0.83 ($p < 0.0001$); Passing and Bablok regression $y=0.93x+0.07$, $y=0.95x-3.80$, $y=0.92x+10.26$ and Bias of -18.1, -7.0 and 6.5. The area under curve (AUC) of TC-BF, PMN% and MN % were 0.98, 0.99 and 0.99 ($p < 0.0001$) respectively.

As for TC-BF at the cellularity cut-off of 5×10^6 cells/L, we obtained a diagnostic agreement of 95%, whereas for PMN% and MN% it was 90% at the cut-off of 50%.

Conclusions: The BC-6800 offers rapid and accurate total cell and differential counts in clinically relevant concentration ranges in CSF, replacing the counting chamber for most samples.

Body fluid analysis for cellular composition; CLSI H56-A, 2006.

P188

VALIDAZIONE ANALITICA DEL DOSAGGIO DELLE METANEFRINE PLASMATICHE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA ASSOCIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA

M. Lucchiari, A. Nonnato, A.R. Vitale, S. Incardona, F. Martinelli, S. Vitali, G. Mengozzi

S.C. Biochimica Clinica, Città della Salute e della Scienza di Torino, sede Molinette

L'ipertensione è una delle più rilevanti patologie nel mondo. Circa lo 0,1% dei pazienti con ipertensione secondaria ha un feocromocitoma, un tumore produttore catecolamine. La quantificazione dei metaboliti o-metilati delle catecolamine liberi nel plasma, la metanefrina (p-MN) e la normetanefrina (p-NMN), è considerata il più accurato test per la diagnosi chimico-clinica del feocromocitoma e per il follow-up dei pazienti con tale patologia (1).

Lo scopo di questo lavoro è validare analiticamente un metodo per il dosaggio delle metanefrine plasmatiche mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UPLC-MS/MS).

Da Febbraio 2014 ad Aprile 2015 sono stati analizzati 638 campioni di plasma di 498 pazienti afferenti al Laboratorio di Biochimica Clinica della Città della Salute e della Scienza di Torino con richiesta di metanefrine plasmatiche, attraverso l'utilizzo dell'ACQUITY UPLC® H-Class-XEVO TQD (Waters, Milford, USA). I campioni sono stati estratti in fase solida con micro piastra SPE Oasis WCX Waters e gli analiti sono stati separati mediante corsa cromatografica con colonna Waters Acquity UPLC BEH Amide 1,7 μ m 2,1x50 μ m e rilevati con il metodo Multiple Reaction Monitoring.

Le curve di calibrazione hanno mostrato ottima linearità ($R^2 > 0.99$). I CV, valutati attraverso l'analisi di due pool, normale e patologico, sono rispettivamente 5.1% e 3.9% per la ripetibilità interserie della p-MN e 8.2% e 10.5% per la p-NMN, mentre sono 15.9% e 11.9% per la riproducibilità intraserie della p-MN e 16.6% e 16.1% per la p-NMN. Il limite minimo di rivelabilità è di 30 pM per la p-MN e di 51 pM per la p-NMN, mentre il limite minimo di quantificazione è rispettivamente 52 pM e 148 pM.

Non è stato osservato carry over. Il recupero in matrice plasmatica è stato del 26.6% per la p-MN e del 141.7% per la p-NMN.

Il metodo validato e introdotto nella routine del laboratorio presenta molti vantaggi tra cui l'efficacia diagnostica, la specificità e la sensibilità analitica, ma anche alcuni svantaggi, legati alla preparazione dei reattivi ripreparati a fresco in ciascun batch analitico e l'assenza di un kit standardizzato nella preparazione dei calibratori e CQ in matrice.

1. Tsirlin A, Oo Y, Sharma R, et al. Pheochromocytoma: a review. *Maturitas* 2014;77:229-38.

P189

CATENE LEGGERE LIBERE SIERICHE: METODO NEFELOMETRICO E TURBIDIMETRICO A CONFRONTO

D. Ciubotaru, K. Proko, S. Altinier, M. Varagnolo, M. Zaninotto, M. Plebani

U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

Introduzione: La misurazione delle catene leggere libere (FLC) nel siero è utilizzata nel monitoraggio e nella prognosi di soggetti con disordini linfoproliferativi. (Dispenzieri A, et al, Leukemia 2009)

Obiettivi: Confrontare un metodo nefelometrico attualmente in uso (BNII, reattivi Binding Site) con le prestazioni di un metodo applicato su strumento turbidimetrico (Optilite (Opt)).

Materiali e metodi: Sono stati analizzati 164 campioni di siero (cp.).

Imprecisione nella serie e tra serie: controlli dedicati Low e High (L, H) in 10 e 20 sedute analitiche in triplicato, rispettivamente. L'imprecisione tra serie è stata eseguita anche su 3 pool di sieri in 5 sedute analitiche. Linearità: diluizioni seriate di 2 cp. con una componente monoclonale specifica per ciascuna catena leggera.

Per entrambi gli strumenti sono stati valutati i tempi analitici in 2 sedute, su un totale di 57 cp.

Risultati: Imprecisione tra serie: κ FLC CV% L=4.75, concentrazione (C,mg/L)=16.13, H=4.01, C=30.81; λ FLC CV% L=4.64, C=30.88, H=5.56, C=63.18; imprecisione nella serie: κ FLC CV% L=2.46, C=15.85, H=1.44, C=31.14; λ FLC CV% L=1.03, C=31.19, H=1.10, C=63.68. Imprecisione tra serie su sieri: κ FLC CV%: 1.91, 1.89, 1.99; λ FLC CV%: 5.77, 9.42, 2.09.

Linearità (n=10, concentrazioni 2.87-33.76 mg/L): regressione lineare: κ FLC (valore misurato, VM)=0.775+0.9387 valore atteso (VA); $r^2=1$; λ FLC VM=-1.537+1.014VA; $r^2=1$.

Confronto tra metodi: Regressione di Deming (95%CI costante=C, proporzionale=P) κ FLC (Opt)=-2.80+1.03 κ FLC (BNII); C da -15.41 a 9.81; P da 0.91 a 1.15, (n=164, concentrazioni 0.73-7876.51 mg/L); λ FLC (Opt)=-0.99+0.91 λ FLC (BNII), C da -14.65 a 12.67, P da 0.68 a 1.13, (n=164, concentrazioni 1.39-15713.62 mg/L). Tempi della prima seduta analitica (30 cp.): primo risultato BNII 45' vs Opt 16'; ultimo risultato BNII 95' vs Opt 55'. Seconda seduta (27 cp.): primo risultato BNII 42' vs Opt 16'; ultimo risultato BNII 110' vs Opt 56'.

Conclusioni: Le prestazioni analitiche, sono soddisfacenti e confrontabili tra materiali di controllo e campioni. Il confronto tra metodi evidenzia differenze non statisticamente significative per entrambi i tests. La facilità d'uso dello strumento Optilite, la robustezza e la produttività oraria attestano la possibile applicazione nella diagnostica clinica di laboratorio.

P190

SOTTOCLASSI DELLE IMMUNOGLOBINE: TURBIDIMETRIA E NEFELOMETRIA A CONFRONTO

K. Proko, D. Ciubotaru, S. Altinier, M. Varagnolo, M. Zaninotto, M. Plebani

U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

Introduzione: La determinazione delle sottoclassi delle IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) ha un importante ruolo nella diagnosi d'immunodeficienze, infezioni ricorrenti del tratto respiratorio e disordini autoimmuni. (Irani V. et al., Mol.Immunol., 2015)

Obiettivi: Confrontare un metodo nefelometrico attualmente in uso, che utilizza reattivi dedicati (Dimension Vista, Siemens), con le prestazioni di un metodo applicato su strumento turbidimetrico di prossima introduzione in commercio (Optilite kit, strumento Optilite, Binding Site).

Materiali e metodi: Imprecisione nella serie e tra serie: controlli dedicati Low, High e Elevated (L, H, E) analizzati in 10 e 20 sedute analitiche in triplicato, rispettivamente. L'imprecisione tra serie è stata eseguita anche su tre pool di sieri (P1, P2, P3) in 5 diverse sedute analitiche.

Sono stati analizzati 123 campioni di siero.

Risultati: Imprecisione nella serie, CV%: IgG1 L=2.77, H=1.63; IgG2 L=0.61, H=0.83; IgG3 L=2.65, H=1.07, E=2.35; IgG4 L=1.99, H=1.06, E=1.36.

Imprecisione tra serie, CV%: IgG1 L=5.22, H=5.33; IgG2 L=3.35, H=3.07; IgG3 L=6.17, H=5.30, E=4.38; IgG4 L=4.60, H=5.27, E=4.80.

Imprecisione tra serie su sieri, CV%: IgG1 P1=3.23, P2=4.04, P3=6.85; IgG2 P1=1.63, P2=1.79, P3=2.61; IgG3 P1=3.33, P2=1.26, P3=1.59; IgG4 P1=1.5, P2=1.8, P3=2.94.

Confronto tra metodi: Regressione di Deming (95%CI costante=C e proporzionale=P): IgG1-Optilite=-0.44+0.88IgG1-Vista; C da -1.37 a 0.50; P da 0.75 a 1.01; IgG2-Optilite=0.26+1.04IgG2-Vista, C da 0.12 a 0.40, P da 0.98 a 1.1; IgG3-Optilite=-0.07+1.81IgG3-Vista, C da -0.17 a 0.04, P da 1.49 a 2.12; IgG4-Optilite=0.03+0.53IgG4-Vista, C da -0.01 a 0.06, P da 0.47 a 0.58.

Conclusioni: Le prestazioni analitiche in termini d'imprecisione sono soddisfacenti e confrontabili tra materiali di controllo e sieri. Il confronto tra metodi non evidenzia differenze statisticamente significative per IgG1. Esiste invece un bias costante per IgG2 ed un bias proporzionale, concentrazione dipendente, positivo per IgG3 e negativo per IgG4. Questi risultati confermano quanto osservato nelle VEQ sulle differenze sistematiche tra misurazioni in nefelometria e turbidimetria, probabilmente dovute all'utilizzo nelle calibrazioni di standard certificati diversi, dichiarati per Optilite e non per Vista.

P191

SERUM FREE LIGHT CHAIN ASSAY INCREASES THE OVERALL SENSITIVITY IN SCREENING OF PLASMA CELL DYSCRASIAS: LABORATORY EXPERIENCE

C. Ferraris Fusarini, F. de Liso, I. Silvani, M.G. Ratti, E. Torresani, R. Maiavacca

Lab. di chimica clinica e microbiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Osp. Maggiore Policlinico

Background: The International Myeloma Working Group (IMWG), as the best screening strategy to detect monoclonal component (MC), indicates to perform only serum test (electrophoresis (PE), immunofixation (IF) and free light chain (FLC) ratio) excepted for amyloidosis AL, condition that requires also urine examination.

Methods: We report 3 cases of our routine that highlighted the usefulness of serum FLC assessment and its ratio in revealing the presence of MC.

All these cases arrived from the department of Haematology and the following exams had been required: serum PE and IF (Sebia, Firenze), serum FLC (Freelite™, Binding Site, Birmingham) and urinary IF (Sebia, Firenze). **Results:** In the two cases we observed normal serum PE, negative serum IF, altered FLC values and its ratio (1st: k 198.06 mg/L, λ 14.13 mg/L, k/ λ 14.01; 2nd: k 44.33 mg/L, λ 7.10 mg/L, k/ λ 6.23), and k Bence Jones proteinuria (BJp) positive. Considering the unexpected result of serum IF, we performed again serum IF using the analytical approach of IF own of urinary samples (more sensitive). Nevertheless, serum IF did not change. This result suggests that FLC test increases the overall analytical sensitivity.

The other case was a woman with serum PE negative, very high FLC levels (k 5617.10 mg/L, λ 0.60 mg/L, k/ λ 9361.83) and urinary IF positive (k BJp). We decided to run serum IF (not requested in this case) and the result was negative. Once again, serum IF with the approach of urinary samples was conducted and the result became positive (k light chain only, without heavy chain).

Conclusions: The cases aforementioned, in agreement with IMWG guideline, strengthen the role of FLC in improving the screening of monoclonal gammopathies in particular in case of micromolecular disease.

Katzmann JA. Screening Panels for Monoclonal Gammopathies: Time to Change. Clin Biochem Rev 2009;30:105-11.

P192

LEUKOCYTES DIFFERENTIAL COUNT IN BAL: PRELIMINARY EVALUATION OF THE BODY FLUID MODULE OF THE SYSMEX XN-1000 HEMATOLOGY ANALYZER IN COMPARISON WITH FLOW-CYTOMETRY

T. Rondelli, M. Lorubbio, A.M.G. Gelli, S. Stefanelli, M. Statello, R. Gallai, G. Marrani, C. Papi, S. Sastrucci, A. Fanelli, R. Caporale, B. Peruzzi

Laboratorio Generale, AOU-Careggi

Introduction: The evaluation of cell morphology and abnormal cell differential counts in Bronchoalveolar lavage (BAL), e.g. >15% lymphocytes (LY), >3% neutrophils (NE) or >1% eosinophils (EO) are crucial to support clinical diagnosis. Automated analyzers may be useful to standardize cellular analysis and to improve laboratory turnaround time (TAT) in comparison with labour-intensive manual methods. In this study we evaluate the performance of the body fluid module of the Sysmex XN1000 (XN-BF) in differentiating WBCs on BAL samples in comparison to flow cytometry (FCM)

Methods: 24 BAL samples were evaluated. FCM was performed preparing a tube containing the following mAbs: CD16-FITC/CD11b-PE/CD13-PE-Cy7/CD14-APC/CD45-APCH7/HLA-DR-V450 and run on BD FACSCanto II. % of LY, NE, EO and monocytes +macrophages (MC) were compared with the results of %LY, %NE, %EO and %MO+HF obtained with the XN-BF. Statistical analysis was performed by Pearson correlation (r value), bias analysis by Bland-Altman plot, assessment of diagnostic performance (Sensitivity, SE; Specificity, SP) by ROC curve analysis

Results: A good correlation was observed between the two methods (r values=0.96; 0.86; 0.99; 0.87) for %LY, %NE, %EO and %MO+HF respectively. The mean differences were -5.8%, 7.3%, -2.7% and 1.5% for LY, NE, EO and MO+HF respectively, showing a significant bias for %NE (95% CI: 3.6 to 11.0) and for %LY (-9.6 to -1.9). At a diagnostic cut-off of >15% LY, >3% NE, >1% EO and <80% MC, the ROC curve displayed an AUC value for the XN-BF of 1.00 (SE=1.0; SP=1.0) for LY, 0.84 (SE=0.88; SP=0.89) for NE, 0.75 (SE=0.67; SP=1.0) for EO and 1.00 (SE=1.0; SP=1.0) for MO+HF at an optimal cut-off of 16% LY, 10.7% NE, 1.1% EO, 76.3% MO+HF respectively

Conclusion: Our results show that XN-BF is a suitable tool for differential cell counts in BAL, with adequate diagnostic performance in recognize abnormal cell patterns. It can replace manual methods in the diagnostic work-up of most BAL samples, reserving the cytospin evaluation for the assessment of cell morphology.

Tricas L, Echeverria A, Blanco MA, et al. Flow Cytometry counting of BAL leukocytes with new profile of moAb combination. J Cytometry part B: 2012;82B:61-66

P193

PERFORMANCE EVALUTATION BETWEEN A NEW POCT PORTABLE DEVICE FOR BLOOD CHEMISTRY TESTS AND TYPICAL LABORATORY INSTRUMENTATION

B.C. Creanza, M. Guida, G. Dirienzo

Dip. Laboratorio Analisi, Ospedale della Murgia "F. Perinei", Asl Bari – Altamura

Background: We test a new POCT portable device (Piccolo Xpress-Abaxis) for blood chemistry tests and we wanted to compare it with the typical laboratory instrumentation AU480 [Beckman Coulter].

Materials and methods: The analysis has been carried out on 107 patients, each of them performed by double sampling, one venous serum tested at the central laboratory and a capillary whole blood analyzed with Piccolo XPress. Values obtained from each parameter (Triglycerides, Total Cholesterol, HDL, LDL, AST and ALT) have been evaluated by the method of linear regression and calculation of the coefficient R^2 . Strumentation: Piccolo XPress[Abaxis] makes use of the spectrophotometric method for the determination of analyte concentration by volume of the sample very small, ~100 μ l; estimates the indices of the sample, hemolysis, icterus and lipemia using absorbance readings at 340nm, 405nm and 467nm. AU480 [Beckman Coulter] makes use of the spectrophotometric and potentiometric methods. The amount of sample required is approximately 25 μ l.

Results: Total Cholesterol $R^2=0.974$; LDL $R^2=0.957$; HDL $R^2=0.973$; Triglycerides $R^2=0.979$; AST $R^2=0.882$; ALT $R^2=0.920$.

Conclusions: Piccolo XPress has proved excellent tool for its characteristics to analyze many samples collected by providing a good correlation with the typical laboratory instrumentation. Another key aspect is the quality of the analytical data systematically guaranteed by automatic execution of Quality Control, through the system EQC. Last observation is to be reserved for Pre-analytical phase: the instrument Piccolo Xpress is able to determine three indices of the serum (icteric, lipemic and hemolytic) and to evidence their possible presence. This aspect is extremely important to avoid any interference on the analytic measurements, thus ensuring a correct result for an immediate and effective diagnosis.

P194

VALUTAZIONE DELLA TERAPIA CON CLOPIDOGREL E ALTRI ANTAGONISTI DEI RECETTORI P2Y12 MEDIANTE AGGREGOMETRIA AD IMPEDENZA: RISULTATI E CRITICITA' INTERPRETATIVE

N. Lelli, R. Rizkallah, P. Ferrari, T. Trenti

Dip. Interaziendale ad Attività Integrata "Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica", Laboratorio Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

Scopo del lavoro: Valutazione della RPA (attività piastrinica residua) in corso di terapia con P2Y12 antagonisti mediante aggregometria ad impedenza (Multiplate ROCHE)

Materiali e Metodi: Il Multiplate misura la aggregazione piastrinica dalle modifiche di impedenza elettrica dovute alla adesione delle piastrine, indotta da agonisti specifici, a elettrodi sensori.

Gli agonisti ADP (ADPtest) e acido arachidonico (ASPItest) valutano la RPA rispettivamente in corso di terapia con P2Y12 inibitori (antiP2Y12: ticlopidina, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor) e ASA. Il TRAPtest (agonista TRAP6) permette una valutazione complessiva della capacità di aggregazione delle piastrine.

I tre test vengono eseguiti in parallelo su tutti i campioni.

Studiati 678 casi; 74% richieste da neurologia (stroke unit), 7.5% da chirurgia vascolare, 3.5% da cardiologia, 3.5% da rianimazione; i restanti da altri reparti. 85% circa in terapia con Clopidogrel.

Risultati: In base al cut off di 46 AU (arbitrary units) ottenuto da studi clinici su pazienti cardiologici in terapia con Clopidogrel e validato dal produttore, il 71.4% dei casi sono definiti "responder".

Suddivisi per farmaco: clopidogrel 580 casi (70% responder, in linea coi dati di letteratura); ticlopidina 55 casi (73%); prasugrel 9 casi (89%, 1 solo non resp) e ticagrelor 34 casi (97%, 1 solo non resp).

Conclusioni: Noi abbiamo applicato un valore soglia ottenuto da studi clinici su pazienti omogenei per patologia e terapia, ad una popolazione eterogenea.

La ratio ADP/TRAP è un parametro più oggettivo perché correlato alla reattività piastrinica individuale (TRAPtest). Ideale sarebbe il confronto della ratio prima e durante terapia. In alternativa, un cut off si potrebbe estrapolare dalla distribuzione dei valori della ratio ADP/TRAP in volontari sani non in terapia.

Assumendo ad esempio un cut off di 0.5 si dovrebbero riclassificare vari casi. Un "non responder" per ADPtest >46 AU può avere una ratio <0.5 in caso di TRAPtest elevato e, viceversa un "responder" per ADPtest <46 AU può, con un basso valore di TRAPtest, avere una ratio >0.5.

In definitiva l'etichetta di "responder" o "non responder" secondo il cut off proposto dal produttore va valutata criticamente.

Thromb Haemost 2014;111:266–72. doi:10.1160/TH13-06-0508.

P195

COMPARISON OF URINARY FREE CORTISOL ANALYZED WITH IN-HOUSE LC-MS/MS METHOD VS IMMUNOCHEMICAL

M. Barbaro, A. Motta, A. Soldarini, M. Locatelli

Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

Introduction: Urinary Cortisol is the most abundant steroid in the blood and the major glucocorticoid produced by the surrenal gland. Biologically active as anti-inflammatory and in the blood pressure homeostasis, cortisol is also involved into gluconeogenesis, in calcium resorption and in the gastric acid and pepsin secretion. It is used as biomarker for surrenal cortex activity and Cortisol measure is useful in the differential diagnosis for Addison and Cushing pathology, in the ipopituitarism and in the surrenaliperplasy, as well as in its cancer.

Materials and Methods: 60 urine samples (24 h collection) where measured with the routine method (Siemens, Germany, Immulite) where then analysed with the in-house developed method consisting in: an automatic preparatory device that works on 96 well microplate (Hamilton, Nevada, Star IVD), an HPLC pump and autosampler (Shimatzu) and a triple quadrupole 5500 mass spectrometer (Sciex, Italia, QTrap 5500). The calibration curve for cortisol and cortisonethe analysis were made starting from methanol standard diluted in water to the concentration of 50 ng/mL (curve: 0, 0.5, 1, 5, 10, 50 ng/mL). Cortisol-D4 was used as internal standard. Results: The LC-MS/MS method shown a better response on samples with low concentrations and a better linearity response, this with the addition of the ability to measure the cortisone present in the samples with the same analytical run.

Conclusions: It is known that immunochemical methods (1) suffer from cortisone interference and the use of a robust method optimized with the preparation made by an automatic device ensure the reproducibility and speed required by a clinical laboratory with the advantage of the accuracy offered by LC-MS/MS systems.

1. Fenske M. How Much "Urinary Free Cortisol" Is Really Cortisol during Water Diuresis in Healthy Individuals? Clin Chem 2004;50:1102-4.

P196

ADVANTAGES OF THE INTRODUCTION OF A COMPLETELY AUTOMATED DIAGNOSTIC COMMERCIAL LC-MS/MS ASSAY FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CYCLOSPORINE A, TACROLIMUS, SIROLIMUS, AND EVEROLIMUS

J. Gervasoni, A. Primiano, R. Manieri, R. Capone, R. Gilestri, P.D. Daloiso, C. Zuppi, A. Schiattarella, S. Persichilli

Dip. di Diagnostica e Medicina di Laboratorio, Policlinico A. Gemelli, Roma

Background and aim: Cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus are four of the most commonly administered immunosuppressant drugs. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become the method of choice for the analysis of immunosuppressants. Many methods have been developed for immunosuppressant analysis involving off-line solid-phase extraction, which is time-consuming and expensive. An on-line extraction method merged with automated sample preparation would be the best solution for a big clinical laboratory.

In this study we evaluate the first commercially available IVD-mass spectrometric immunosuppressant assay comparing it to routinely used immunometric methods.

Methods: The IVD assay consists of a Microlab STARlet IVD liquid handling platform (Hamilton) which automates the sample preparation and MassTox® Immunosuppressants kit (Chromsystems). Barcode reading, sample resuspension, transfer into a deep-well plate and the whole procedure is performed by the robotic system. The only manual actions within the entire process are decapping of the tubes, and transfer of the deep-well plate from the robotic system to the HPLC autosampler. A tandem mass spectrometer (API 4500, AB SCIEX) combined with an HPLC (Nexera, Shimadzu) with electrospray ionization in positive ion mode was used for analysis. Isotope-labeled internal standards were used. Within- and between-day and accuracy were determined for the 4 quality controls. Samples from external international proficiency testing schemes were measured to assess the accuracy. 150 patient samples analyzed with this method were compared with routine results.

Results: Total imprecision was lower than 12%. Accuracy ranged between 82% and 111% for quality control samples and between 89% and 112% for samples from the external quality assurance program. The method showed a good agreement ($r^2 > 0.91$) with the immunometric methods in patient samples for all immunosuppressants even if a negative bias was observed for cyclosporine. Conclusion: The automated IVD assay is suitable for routine analysis, since it is accurate and precise. Furthermore, total automation increases throughput and minimizes the risk of mistakes in the quantification of whole blood immunosuppressant compared to conventional methods

P197

BJP-IFE AND IT AS METHODS IN BENCE JONES PROTEIN RESEARCH

F. Gulli¹, C. Napodano¹, L. Colacicco¹, G.L. Rapaccini², U. Basile¹

¹*Department of Laboratory Medicine -Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy*

²*Department of Internal Medicine -Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy*

Background: Bence-Jones proteinuria (BJP) is characterized by the presence of monoclonal light chains in the urine. BJPs are still regarded as the only marker of monoclonality in lymphoproliferative diseases: consequently, BJP detection is included in recent updates of most international guidelines.

In 16–18% of cases, only light chains can be detected either in serum and urine or in urine only.

In capillary zone electrophoresis (CZE) abnormal fractions are always suspect of being monoclonal proteins and therefore, an indication of monoclonal gammopathies. Capillary immunotyping (IT) is performed with specific antibodies to identify these abnormal fractions. Immunofixation techniques (IFE) are widely accepted preferred method of investigating monoclonal proteins in urine. It is also considered the best method to document the presence and the complete remission of the BJP.

The aim of our study is to compare the performance of BJP-IFE and urine IT for detection and identification of monoclonal proteins in urine samples, all performed on Hydrasis and Capillarys Electrophoresis Instrument (Sebia-France).

Materials and methods: 100 patients (64 males, 36 females) were recruited for this study. Concentrated Urine samples from each patient were analyzed with two different methods: CZE with immunotyping and BJP-IFE according to the manufacturer's instructions. All statistical analysis was performed using StatSoft software (StatSoft Inc. USA).

Results: Although both methods are useful for detection and identification of monoclonal proteins in urine samples, BJ-IFE performance demonstrated to have higher sensitivity, reducing false negative results vs IT performance.

Conclusions: This study showed that there was a greater correlation between IT vs BJP-IFE. However IFE-BJ is more sensitive. Finally our study confirms the validity of the immunofixation as gold standard for the detection and characterization in the Bence-Jones Protein research.

P198

PERFORMANCE AND SENSITIVITY OF SCREENING ELECTROPHORETIC METHODS FOR THE RESEARCH OF BENCE JONES PROTEIN

C. Napodano¹, G. Cigliana², F. Gulli¹, E. Torti¹, M.T. Dell'Abate¹, E. De Santis¹, L. Conti², U. Basile¹

¹*Department of Laboratory Medicine, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy*

²*Department of Prevention and Diagnostic Oncology, Laboratory of Clinical Pathology, National Cancer Institute "Regina Elena", Rome, Italy*

Background: Bence-Jones proteinuria (BJP) is characterized by the presence of monoclonal light chains in the urine. BJPs are still regarded as the only marker of monoclonality in lymphoproliferative diseases.

According to guidelines, "all patients should have a serum protein electrophoresis, a urine protein electrophoresis of a 24-hour urine specimen (if needed of a concentrate), immunofixation in serum (s-IFE) and urine (u-IFE), as well as determination of serum free light-chains and their ratio. Immunofixation techniques are widely accepted preferred method of investigating monoclonal proteins in urine. It is also considered the best method to document the presence and the complete remission of the BJ protein. Detection of BJP is mostly performed by urine Immunofixation techniques, which implies cumbersome manipulations and costly techniques. For this reason, a screening method before BJP analysis is preferable.

The aim of our study is to determine the most clinically effective diagnostic testing strategy for the evaluation of monoclonal components in urine

Methods: 870 patients (460 males, 410 females) were recruited for this study. Urine samples from each patient were analyzed with three different methods: PENTA-IFE (Pentavalent IFE), Urine HRE (High Resolution Electrophoresis) and BJP-IFE. Age distribution of patients was analyzed. Chi-Square test was performed so as to assess differences between Urine-HRE and Penta-IFE, using BJ-IFE as reference technique. All statistical analysis was performed using StatSoft software (StatSoft Inc. USA)

Results: A significantly higher mean age was observed among positive patients ($p < 0.05$).

Both URINE HRE and PENTA-IFE appear to correlate with results obtained by BJ-IFE, despite PENTA-IFE results show greater connection with reference values obtained by BJ-IFE.

Conclusions: Both PENTA-IFE and URINE-HRE are correlated with the reference method BJ-IFE. PENTA-IFE is has a significantly greater degree of association with the BJ-IFE method.

P199

ANALISI MOLECOLARE NELLO SCREENING DEL PORTATORE DI FIBROSI CISTICA: CONFRONTO TRA DIVERSE METODOLOGIE ANALITICHE

S. Egiziano, A. Ramuscello, C. Salbe, M. Favarato

AULSS 12 Veneziana, Dipartimento di Patologia Clinica, UOS Diagnostica Molecolare

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator" (CFTR), associate a manifestazioni cliniche di gravità diversa e con distribuzione geografica eterogenea [1]. Il test molecolare di I° livello, applicato allo screening del portatore di FC, deve poter garantire, oltre ad una sensibilità e specificità elevate, una detection rate adeguata per la popolazione analizzata, al fine di ridurre significativamente il rischio residuo, ma anche rapidità di esecuzione. Lo scopo di questo studio è focalizzato sulla valutazione di un nuovo approccio metodologico per l'identificazione delle mutazioni a carico del gene CFTR, NanoChip400@-CF70 (Relab/Savyon Diagnostics), in confronto al sistema attualmente in uso, INNO-LiPA CFTR (INNO-LiPA CFTR17+Tn, INNO-LiPA CFTR19, INNO-LiPA Italian Regional) (Fujirebio). Entrambe le metodologie analitiche analizzano un pannello di mutazioni tale da garantire una detection rate dell'84,8% per la nostra area geografica. Sono stati analizzati, previo consenso informato, 300 campioni di DNA provenienti da pazienti che si erano sottoposti allo screening del portatore di FC. Di questi, 192 con genotipo eterozigote (frequenza genotipica: 0,640), 2 con genotipo mutato in omozigosi o eterozigosi composta (frequenza genotipica: 0,007) e infine 106 con genotipo normale (frequenza genotipica: 0,353). Entrambi i metodi analitici hanno evidenziato concordanza dei risultati sia per i campioni mutati che per i soggetti sani. Inoltre, per 6 pazienti, NanoChip400@-CF70 ha permesso di effettuare una discriminazione genotipica per mutazioni non distinguibili con il sistema in uso (E217G, R334Q, 621+3A>G). I campioni di DNA utilizzati erano stati estratti mediante tre diversi metodi estrattivi: Arrow (Norddiag), NucliSENS@EasyMAG@ (Biomerieux) e MD2000sp (Abbott), consentendo di effettuare anche una valutazione della sensibilità in base alle diverse qualità del DNA utilizzato. Entrambi i metodi si sono dimostrati affidabili e riproducibili; l'impiego di NanoChip400@-CF70 permette un'automazione del processo analitico più completa ed una maggiore risoluzione.

1. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179–96.

P200

AMOXICILLIN-ASSOCIATED INTERFERENCE IN AN HPLC-EC ASSAY FOR URINARY FRACTIONATED METANEPHRINES: POTENTIAL PITFALL IN PHEOCHROMOCYTOMA BIOCHEMICAL DIAGNOSIS

S. Barco, I. Gennai, L. Barbagallo, A. Maffia, D. Bugnone, M. Talio, P. Bonifazio, G. Tripodi, G. Cangemi

Lab. Centrale di Analisi, Istituto Giannina Gaslini, Genova

Measurement of urinary fractionated metanephrines represents a first-line test for the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. High performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-EC) is the gold standard methodology for metanephrines measurement. HPLC-EC assays used in the routine clinical laboratory can be subjected to analytical interferences by the presence of drugs or their metabolites. We describe interference on urinary normetanephrine (uNMN) caused by amoxicillin. Two pediatric patients suspected of pheochromocytoma had very high uNMN levels (2543 and 4227 µg/g Cr respectively; upper reference value: 339 µg/g Cr). Amoxicillin interference was assessed by comparison for co-elution with uNMN and by LC-MS/MS analysis. After amoxicillin interference was suspected and the therapy was stopped uNMN levels returned to normal (149 and 214 µg/g Cr respectively). Chromatograms obtained by HPLC-EC clearly showed that amoxicillin co-elutes with uNMN. Patients' uNMN levels measured by LC-MS/MS were in the normal range. Amoxicillin is responsible for analytical interference on HPLC-EC assay for uNMN. This finding can be of help in distinguishing true- positive from false-positive results in the course of a biochemical diagnosis for pheochromocytoma.

P201

A CASE OF LIGHT CHAIN ESCAPE-MULTIPLE MIELOMA (LCE-MM): IMPORTANCE OF SERUM FREE LIGHT CHAIN (sFLC) ASSAY IN RELAPSE DETECTION

L. Tognazzi¹, B. Gamberi¹, E. Bellesia², M. Quaresima¹, E. Rivolti¹, O. Bonanno², F. Merli¹

¹Haematology Unit, Oncology Department, Azienda Ospedaliera Arcispedale Santa Maria Nuova, IRCCS, Reggio Emilia, Italy

²LACCE, Azienda Ospedaliera Arcispedale Santa Maria Nuova, IRCCS, Reggio Emilia, Italy

Background: Multiple myeloma cases that at diagnosis produce an intact immunoglobulin chain can relapse, after a period of partial or complete remission, transforming in light chain producing disease. This phenomenon has been known for a long time and has been defined "light chain escape". Recently, sFLC assay has allowed to measure levels of free κ and λ chains and can be used to monitor disease.

Case report: A 62-year old male was diagnosed with IgG κ , stage I (according to ISS) MM (del 13q14) in february 2009. Serum protein electrophoresis (SPEP) revealed a monoclonal protein spike (2,38 g/dl), serum immunofixation (IF) disclosed an IgG κ paraprotein, κ FLC were 178 mg/l. Bone marrow aspiration showed 35% of plasma cells. Multiple costal fractures were present. Patient received VTD (bortezomib, thalidomide, dexamethasone) therapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation (auto PBSCT) and obtained a complete remission with negative SPEP, IF and sFCL. Two years after transplantation patient showed a rapidly progressive sFCL (to a maximum of 13900 mg/l), with negative SPEP. A grade 1 anaemia (10,8 g/dl) was present, neither renal failure nor bone lesions. Plasma cells infiltrating bone marrow were 90%. Patient was treated with VCD (bortezomib, cyclophosphamide, dexamethasone), second auto PBSCT, VD consolidation (bortezomib, dexamethasone), thereby obtaining a complete remission with negative bone marrow aspiration, IF and sFCL (15,5 mg/l). Seven months later sFCL increased to 2820 mg/l with a bone marrow infiltration of 40%. Treatment with Rd (lenalidomide, dexamethasone) was started and complete remission was induced, which has been lasting for 19 months.

Discussion: Our patient represents a case of LCE-MM in which serial detection of sFCL permits early recognition of progressive disease due to a subclone expansion not identified by classical diagnostic tools (i.e. SPEP); follow-up of sFCL can thus prevent further complications and improve treatment results.

P202

CASO DI UN PAZIENTE CON MANCATA ESPRESSIONE PER IL LOCUS C282Y DEL GENE HFE

M. Materazzi, S. Uffreduzzi, G. Lupi, G. Palmieri, A. Scaccetti

Struttura Semplice Dipartimentale Ematologia in Citometria, Azienda Ospedaliera "S Maria", Terni

Il gene HFE individuato nel 1996 è responsabile dell'Emocromatosi di tipo I, malattia ereditaria che conduce ad un progressivo accumulo di ferro e danno d'organo con livelli di ferritinemia molto elevati nel tempo. Nella popolazione italiana le due mutazioni più comuni sono quelle per il C282Y e l'H63D. L'ipotesi attualmente più accreditata è che HFE sia un regolatore di Epcidina e che l'Emocromatosi di tipo 1 in generale sia una malattia da inappropriata produzione di Epcidina. In sintesi il gene HFE con i suoi loci principali C282Y e H63D regola la produzione di Epcidina che inibisce a sua volta la Ferroportina1. In caso di mutazioni di questi due loci si ha sovraccarico di ferro per diminuzione dell'Epcidina, ma in rarissimi casi (2 documentati fino ad ora) la completa assenza del locus C282Y fa sì che il ferro sia drammaticamente assorbito ininterrottamente, senza alcun meccanismo di controllo a feedback negativo con conseguenti danni, soprattutto a livello epatico, irreversibili e fatali.

Nel gennaio 2015 si ricoverava presso il nostro Ospedale il paziente M.U di anni 68 con un quadro clinico da spiccato danno epatico (aumento delle transaminasi Ggt fosfatasi alcalina e bilirubina) e livelli di ferritina sierica molto elevata (5400 ng/ml). La scoperta delle cause di una tale condizione patologica è avvenuta con l'esecuzione del test per le mutazioni del gene HFE (kit Nuclear Laser Medicine 15 mutazioni) che evidenziava in modo sorprendente che il paziente non esprimeva il locus C282Y né nella forma wild type né nella forma mutata. Poiché era venuto a mancare il principale regolatore dell'epcidina, essa a sua volta non aveva potuto inibire la ferroportina portando il malato ad accumulare una quantità di ferritina tale da provocare un quadro clinico gravissimo.

Sono noti solo due casi al mondo in cui è descritta la delezione del gene HFE sul cromosoma 6, una paziente sarda (Associazione per lo studio dell'Emocromatosi, luglio 2005) ed una paziente francese pubblicato su Blood 2008;112:5238.

P203

UN CASO DI MIELOMA MULTIPLO IGG KAPPA IN CUI LA MISURA DELLE FLC HA EVIDENZIATO PRECOCEMENTE UNA RIPRESA DI MALATTIA DI TIPO " LIGHT CHAIN ESCAPE"

M. Berardi¹, M. Staderini², A. Terreni¹, C. Nozzoli², T. Biagioli¹, M. Brogi¹, A. Gironi¹, F. Cassani¹, A. Bosi², A. Caldini¹

¹Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

²Ematologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Il mieloma multiplo (MM) è caratterizzato nell'80% dei casi dalla proliferazione B-linfocitaria di un clone neoplastico secernente Ig intatte. Nel 10% dei MM IgG e IgA in remissione, la ricaduta è evidenziata solo dall'aumento delle catene leggere libere nel siero (Freelight®, The Binding Site, UK; FLC). Questo tipo di ricaduta, definita "light chain escape" (LCE), sembra inoltre essere associata ad una peggior prognosi (1). Pertanto la misura delle FLC, soprattutto nei pazienti trattati con i nuovi regimi terapeutici (2), riveste particolare importanza.

Nel settembre 2007 a un uomo di 55 anni viene diagnosticato un MM al III stadio, sintomatico per lesioni ossee: IgGK 83.5 g/L; proteina di Bence Jones (BJP) kappa 910 mg/24h; BOM 80% plasmacellule monotipiche Kappa. Il paziente viene trattato con Bortezomib, Talidomide e Desametasone prima di un doppio trapianto autologo di cellule staminali (ottobre 2008 e aprile 2009). Nel maggio 2011 il paziente, in recidiva per la CM originaria (IgGK 15.1 g/L), comincia la terapia con Lenalidomide e Desametasone.

A maggio 2013 il paziente ottiene una risposta ematologica completa stringente: immunofissazione sierica (sIFE) negativa, BJP negativa, rFLC nella norma). A settembre 2014 si evidenzia un aumento delle FLC con uno sbilanciamento del ratio (FLCk 45 mg/L; κ/λ 6.1), che si conferma e progressivamente aumenta a ottobre (FLC k 62 mg/L; κ/λ 9.4) e a gennaio (FLC k 814 mg/L; κ/λ 370), mentre restano sempre negative la sIFE e la BJP. Il controllo successivo a febbraio 2015, dopo 40 cicli di terapia con Lenalidomide/Desametasone, ha evidenziato: FLCk 1244 mg/L con κ/λ 544; sIFE positiva per catene leggere libere K, BJP K positiva, BOM analoga all'esordio. Il paziente ha quindi cominciato la nuova terapia con Bendamustina, Velcade e Desametasone. L'alterazione dell' rFLC, in questo caso, ha anticipato l'insorgenza del LCE rispetto alle indicazioni internazionali (3), che prevedono la ricomparsa della CM in siero/urine o una concentrazione della FLC coinvolta di almeno 100 mg/L con il rapporto κ/λ alterato, rispettivamente di cinque e quattro mesi.

1. Brioli A, Giles H, Pawlyn C, et al. Blood 2014;123:3414-9.

2. Dawson MA, Patil S, Spencer A. Haematologica 2007;92:143-4.

3. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. Leukemia 2006;20:1467-73.

P204

TEST CITOFUORIMETRICO NELLA DIAGNOSTICA DELLA LEUKOCYTE ADHESION DEFICIENCY (LAD TIPO 1)

P. Selva¹, M. Bassi¹, F. Specchia², M. Sarma¹, R. Alvisi¹, R. Mancini¹, A. Pession²

¹Laboratorio Unico Metropolitano, Bologna

²U.O. Pediatria Prof. Pession, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico S. Orsola- Malpighi, Bologna

La migrazione dei leucociti all'interno del sito di infiammazione è un evento cruciale per la difesa nei confronti dei patogeni e si realizza grazie alla presenza e interazione di famiglie diverse di molecole di adesione espresse sia sui leucociti che sulle cellule endoteliali, in un processo dinamico a più stadi ("adhesion cascade"). Difetti di funzione o espressione, parziale o totale, di queste molecole determinano un "Deficit di molecole di adesione leucocitaria" (Leucocyte Adhesion Deficiency), causa di una grave e rara forma di immunodeficienza primitiva, a trasmissione autosomica recessiva, di cui sono note 3 varianti (LAD-I, LAD-II, LAD-III).

LAD-1: è dovuta a mutazioni a carico del gene ITGB2 (21q22.3), che codifica per la subunità comune della $\beta 2$ integrina CD18, che legata al CD11a forma il complesso LFA-1 proteina, necessaria alla stabile adesione dei leucociti all'endotelio. La ridotta funzione o espressione della $\beta 2$ integrina è causa di manifestazioni cliniche ricorrenti e gravi sin dall'età neonatale (onfalite, periodontiti, infezioni batteriche e micotiche, ritardo di cicatrizzazione

Caso clinico: pz. di 31 aa. con ricorrenza di otiti medie acute perforate, piodermiti, stomatiti aftose, gengiviti, deficit dei processi riparativi (ritardata caduta del moncone ombelicale, ferite escariotiche, fistole) peritonite e shock settico da appendicite acuta (da Aspergillus).

Profilo laboratoristico: la valutazione citofluorimetrica della distribuzione quantitativa recettoriale delle molecole di adesione CD18, CD11a e CD44 dei linfociti, monociti e granulociti effettuato mediante valutazione MFI ricavata da curva di calibrazione su sangue periferico del pz., ha evidenziato la normale espressione di CD44, molecola di adesione non coinvolta nella LAD, e la significativa riduzione di CD18 e CD11a, espressione di un deficit parziale di LAD-1.

Conclusione: la citofluorimetria a flusso ha consentito nel nostro caso di evidenziare variazioni di espressione delle molecole di adesione sui leucociti, rappresentando un rapido e valido test per la diagnosi di una malattia grave come la LAD

1. Leukocyte adhesion deficiencies. Ann N Y Acad Sci ISSN 0077-8923.

2. Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndrome. Curr Opin Hematol 2013;20:16-25.

P205

USEFULNESS OF FREE LIGHT CHAINS (sFLC) DOSAGE IN A COMPLEX CLINICAL CASE OF MULTIPLE MYELOMA (MM) WITH ACUTE KIDNEY INJURY (AKI)L. Antonioni¹, L. Panicali², P. Malpassi¹, A. Zacchini¹, E. Mancini², R. Mancini¹¹Laboratorio Unico Metropolitano di Bologna (LUM)²Nefrologia Dialisi, Policlinico Sant'Orsola Malpighi di Bologna

Background: The sFLC can be nephrotoxic and can cause a number of renal complications. Severe AKI is a devastating complication of Multiple Myeloma.

Results: A 39-year female patient, with K sFLC Multiple Myeloma, ISS stage 3 and AKI (KDIGO Stage 3) referred to the Nephrology, Dialysis, Hypertension Unit for a second opinion. Hypercalcemia, anemia, bone disease, systemic amyloidosis with renal, cardiac involvement and macroglossia were associated.

In another hospital, she was treated with chemotherapy and haemodialysis (HD) with an initial haematological success. After the second cycle of therapy, however, the serum level of the K FLC peaked up to 61,000 mg/L, and therapy was interrupted because the disease was considered as non responder. The first dosage of the K FLC (Freelite™, The Binding Site-Instrument IMMAGE Beckman Coulter) performed at the Metropolitan Laboratory (LUM) in Bologna was 15,000 mg/L. Hematologists and Nephrologists, considering the young age of the patient, decided to go on with a combined, pharmacological and extracorporeal therapeutical approach. She restarted chemotherapy (four cycles Bortezomib-Talidomide-Desametasone + Cyclophosphamide) associated with "Enhanced Adsorption Dialysis". This technique uses a double dialyzer (polymethylmetacrilate membrane) able to remove the FLC (by adsorption) and uremic solutes (by filtration) efficiently. She finally underwent a hematopoietic stem cell transplantation. K FLC went down to 400 mg/L and, at discharge, 100 mg/L. The haematological disease was declared in remission but she didn't recover renal function. At present, she is on maintenance dialysis and on haematological therapy with lenalinomide, the last measurement of K FLC is 6.7 mg/L.

Conclusion: Since the artificial removal of FLC needs complex and expensive treatments, the most appropriate technique and the timing of its application have to be defined on the basis of the circulation levels and the response to chemotherapy. The quantitative measurement of sFLC has a strong and powerful value in supporting the decision making, including the extracorporeal removal.

P206

MONITORING OF CHIMERISM ON SORTED PERIPHERAL CD34+ CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA RECEIVING ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANT: A CASE REPORTT. Rondelli², M.I. Bonetti¹, B. Peruzzi², F. Mannelli¹, A. Lari³, S. Bencini¹, I. Cutini¹, R. Caporale², G. Iaquinia³, A.M.G. Gelli², F. Torricelli³, A. Bosi¹¹Unità Funzionale di Ematologia, AOU-Careggi²Laboratorio Generale, AOU-Careggi³Diagnostica Genetica, AOU-Careggi

Background: An early detection of neoplastic cells after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) in adult patients affected by acute leukemia provides the opportunity to manage and control the potential re-emergence of malignant clone. Several groups have reported as rapidly increasing mixed chimerism correlates with higher risk of relapse.

Aim: Some predictors of impending relapse are monitoring of Minimal Residual Disease (MRD) by flow cytometry (FC) and PCR-based chimerism on both Bone Marrow (BM) or Peripheral Blood (PB) samples at specific time-points after HSCT. Restricting chimerism analysis to sorted CD34+ cells could be an early predictor of relapse after HSCT.

Methods: At diagnosis was established for each patient the most useful leukemia-associated aberrant immunophenotype (LAIP) to be investigated at specific time-points during treatment plan to detect LAIP-positive cells. DNA was extracted from PB of donor and recipient before HSCT and chimerism assessment was performed on whole PB and sorted CD34+ cells of recipient after HSCT at specific time points: day 30, 60, 100, 180, month 12 and 18 from HSCT. The project is funded by Ministero della Salute and Regione Toscana (CUP D11J09000190003).

Results: The case we report on was enrolled in the project at April 2012. At day 30 from HSCT (matched unrelated donor), the chimerism on whole PB was 100% donor with MRD-negative; of note, chimerism on sorted CD34+ cells was 60% donor. At day 60, FC-MRD converted to positive (0.23% of global cells) whereas chimerism on whole PB was still 100% donor. At day 100, chimerism on whole PB decreased and the patient experienced BM relapse. Chimerism analysis on sorted CD34+ cells allowed a very early diagnosis of disease recurrence by highlighting the presence of the patient's cells at the first time-point with concomitant "negative signals" from FC-MRD and whole PB chimerism.

Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2009;94:1613-7.

P207

INIBITORE DELLA TROMBINA IN UN PAZIENTE CON MIELOMA MICROMOLECOLARE

S. Valverde¹, R. Canistro², F. Gessoni¹, A. Boscolo-Bariga³, G. Gessoni¹

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale Chioggia

²Onco-Ematologia, Ospedale Chioggia

³Medicina Generale, Ospedale Chioggia

Introduzione: La comparsa di un inibitore acquisito della coagulazione è una evenienza rara che però deve essere tenuta presente nella diagnostica differenziale di una sindrome emorragica ad insorgenza acuta in assenza di storia familiare. Riportiamo il caso di un inibitore acquisito del FII insorto in un paziente con mieloma micro molecolare.

Case report: GC, maschio di anni 58, affetto da mieloma a catene leggere K in progressione in terapia con Talidomide e Coumadin si presenta alla nostra osservazione in data 26/06/07 per porpora. Al ricovero le piastrine erano 18E9/L, RBC 3.3E12/L, Hb 96g/L, WBC 6.06E9/L, PT 14.1 sec, aPTT 31 sec, TT 24, Fibrinogeno 534 mg/dL. Il 30/06 si osserva l'aggravamento della sintomatologia emorragica con ematomi cutanei, mucosi, intramuscolari, gemizio ematico dalle vie di infusione. Il PT era 31 sec, aPTT 120 sec, TT 100 sec, il test di mixing eseguito su aPTT e TT non correggeva; la ricerca del lupus anticoagulant era negativa, il dosaggio del FII evidenziava una attività <10%, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, vWF erano nella norma così come il tempo di reptilasi. Il paziente veniva trattato con supporto trasfusionale ma sviluppava una setticemia da Stafilococco coagulasi negativo con insufficienza multi organo e l'exitus sopraggiungeva in data 29/07/07.

Conclusioni: Autoanticorpi inibitori dei fattori della coagulazione possono insorgere in soggetti affetti da patologie autoimmunitarie o neoplastiche. Più frequentemente, essi sono diretti contro il FVIII peraltro sono stati, infatti, descritti inibitori acquisiti di FII, FV, FVII, FIX. Un prolungamento tanto di aPTT che del PT, non corretti nel test di miscela con plasma normale, sono indicativi per la presenza di inibitore di FII, FV o FX. In caso di inibitore anti-FII, il TT è notevolmente allungato mentre, come nel nostro caso, il tempo di reptilase è nella norma. Così come assai ridotta è risultata la attività del FII. Si concludeva per la presenza di un inibitore acquisito del FII in corso di mieloma multiplo.

P208

THROMBOELASTOMETRY IN MANAGEMENT OF A DABIGATRAN TREATED PATIENT IN A PERIOPERATIVE SETTING

v. Sara¹, M. Tedesco², F. Gessoni¹, L. Valle³, A. Grassetto², R. Valle³, S. Ramuscello⁴, G. Gessoni¹

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale Chioggia

²Terapia Intensiva, Ospedale Chioggia

³Cardiologia ed UTIC, Ospedale Chioggia

⁴Chirurgia Generale, Ospedale Chioggia

Background: The main specificities of Dabigatran (DAB) are predictable pharmacokinetics and pharmacodynamics but special attention should be paid in the elderly, in case of renal dysfunction and in case of emergency. In addition, their perioperative management is challenging, especially with the absence of specific antidotes. This paper provides a case report concerning the management of a patient in the perioperative setting, including the estimation of the bleeding and thrombotic risk, the periods of interruption, the usefulness of laboratory tests before surgery or invasive procedure.

Case Report: A 80 year old female with multiple medical problems: atrial fibrillation treated with DAB 75 mg twice daily, myelodispalsia, previous mastectomy, colostomy, hip prosthesis, presented to the emergency department with a bowel occlusion. In table I were reported results of the main coagulation assay performed and specific treatment with fresh frozen plasma (FFP), packed red cells (PRC) and Prothrombin concentrates (PCC)

Discussion: No antidote is available for dabigatran. Dialysis has been shown to be effective to remove dabigatran. Treatments proposed for bleeding include PCC, activated PCC and rFVIIa, but neither has been tested clinically. In emergencies, it may be advisable to wait for two half-lives (34h) for dabigatran concentrations to reach acceptable concentrations. However, given widely varying inter individual elimination rates, this is merely fallback solution. In this patient, we used the Thromboelastometry, that, despite the presence of clotting times still very elongated (especially TT) has allowed it to evaluate the potential clotting was satisfactory, therefore has been successfully performed a laparotomy, placing the utmost care in surgical hemostasis. The transfusion requirements was limited to two units of GRC. This case could then suggest an interesting application of Thromboelastometry, in the evaluation of the global hemostasis in subjects treated with dabigatran.

P209

RIDUZIONE DELLA AZIONE ANTICOAGULANTE DEL WARFARIN DURANTE TERAPIA CON MESALAZINA

S. Valverde¹, P. Pavanato², F. Gessoni¹, L. Valle³, R. Canistro⁴, M.C. Galizia⁵, R. Valle³, G. Gessoni¹

¹Dip. Patologia Clinica²MMG³Cardiologia ed UTIC⁴Ematologia⁵Farm Osp

Premesse: Descriviamo il caso di una paziente in terapia con warfarin che ha presentato la normalizzazione del PT a seguito della assunzione di mesalazina

Descrizione del Caso: BI femmina di anni 69 affetta da gastrite, ipertensione, osteoporosi, depressione in terapia con warfarin per pregressa TVP. La paziente mantiene un INR in range assumendo 3.75 mg/die di farmaco. Nell'aprile 2014 inizia terapia con mesalazina per la profilassi della diverticolite. Il valore di INR inizia gradualmente ad abbassarsi non ostante il graduale aumento della dose di farmaco. La paziente viene inviata al nostro Laboratorio per uno studio coagulativo: PT 13.1 sec, INR 1.01, aPTT 23 sec, TT 20.3 sec, Fibrinogeno 393 mg/dL, AT 83%, PC 115%, PS 95%, FII 98%, FV 112%, FVII 102%, FVIII 87%, FIX 95%, FX 104%. Si procedeva alla sospensione della mesalazina si assisteva ad una pronta ripresa della azione anticoagulante del warfarin.

Discussione: I pazienti in trattati con antagonisti della vitamina K sono spesso anziani affetti da multiple patologie che comportano la assunzioni di differenti farmaci molti dei quali, almeno potenzialmente, in grado di interferire a vario livello con la terapia anticoagulante. Tali potenziali interferenze dovrebbero sempre essere tenute in considerazione in caso si verificassero, in costanza di trattamento, delle alterazioni dell'effetto anticoagulante. Nel mese di aprile 2014 viene diagnosticata una diverticolosi per cui inizia un ciclo con mesalazina (1600 mg/die), già nel controllo del 24/05 si osserva una riduzione di INR che continua non ostante l'aumento graduale della dose di warfarin somministrata che passa a 5 poi 7.5 ed infine a 10 mg/die. In data 02/07 INR è 1.01. A questo punto la paziente viene estensivamente valutata ed il dosaggio dei fattori vitamina K dipendenti: FII, FVII, FIX, FX. PC e PS presentavano valori non compatibili con il tipo di terapia in atto. Veniva condotta una accurata anamnesi farmacologica e la attenzione si focalizzava sul trattamento, di recente introduzione, con mesalazina. Si proponeva quindi la sospensione del farmaco con pronta ripresa dell'azione anticoagulante del warfarin e possibilità di tornare rapidamente al dosaggio abituale.

P210

INCONGRUENZA FRA FENOTIPO OSSERVATO E SESSO CROMOSOMICO

D. Dell'Edera¹, M. Leo¹, I. Veneziano², M. Benedetto¹, M. Pilato¹, A.A. Epifania¹

¹U.O.D. di Citogenetica e Genetica Molceolare, Osp. Madonna delle Grazie, Matera²U.O.C. di Urologia, Osp. Madonna delle Grazie, Matera

Descriviamo il caso di un uomo di 55 anni giunto alla nostra attenzione per eseguire l'esame del cariotipo in base ai risultati di indagini endocrinologiche che avevano rivelato un FSH di 26.9 mUI/ml (v.n.: 1.3 – 19.3); LH di 12.0 mUI/ml (v.n.: 1.2 – 8-6); Testosterone di 0.50 (v.n.: 1.75 – 7.81). Inoltre, lo spermogramma eseguito più volte aveva confermato l'azoospermia.

L'esame fenotipico non evidenziava segni dismorfici. Il volume testicolare era di 1 cc a sinistra e 1.4 cc a destra (ipotrofia testicolare) e l'esame ecografico dei testicoli e della prostata mostrava caratteristiche morfo-strutturali e vascolari nella norma. L'esecuzione dell'indagine citogenetica eseguita su colture di linfociti di sangue periferico, stimolati con PHA, dopo analisi di 50 metafasi con le tecniche di bandeggio GTG, CBG, mostrava cariotipo 46 XX.

Questo risultato è stato approfondito con tecniche di citogenetica molecolare (FISH), per individuare la presenza o l'assenza del gene SRY (SEX determining Region Y). L'esame FISH ha documentato la presenza del gene SRY localizzato sul braccio corto del cromosoma Y, traslocato sulla estremità del braccio corto dell'X con seguente risultato: 46 XX, ish der (X) t (X; Y) (p22.3; p11.3) (SRY+). Tale risultato è stato confermato mediante P.C.R..

Il quadro citogenetico era compatibile con la sindrome del maschio XX, condizione per molto aspetti assimilabile a quella molto più comune del maschio XXY. La peculiarità di questo caso clinico risiede nella diagnosi e quindi del trattamento terapeutico, resi possibili dalla stretta collaborazione tra l'urologo-andrologo ed il genetista di laboratorio.

P211

LA CITOFLUORIMETRIA DEL LIQUOR NELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE B

L. Pichi, F. Pauselli, F. Bottan, R. Pica, M. Gaudio

U.O.C. Patologia Clinica, A.O. San Giovanni Addolorata, Roma

Scopo dello studio: La CFM può documentare l'infiltrazione meningea di LNH a cellule B in campioni di liquor cefalorachidiano anche in assenza di significativa pleiocitosi.

Materiali e metodi: Un uomo di 78 anni affetto da linfoma mantellare diagnosticato circa un anno prima e successivamente in stato di remissione dopo trattamento CHT viene ricoverato nel N.O. in condizioni di moderato stato confusionale. La TAC cranica evidenzia lesioni encefaliche multiple di dubbia interpretazione. Si invia in laboratorio un campione di LCR.

Risultati: L'esame chimico fisico evidenzia lieve aumento della cellularità (13 cellule/mmc) in assenza di altre alterazioni. L'esame CFM mostra una cospicua popolazione di linfociti B (40% circa) CD5+ privi di slg.

Discussione e conclusioni: Nel caso esposto la CFM è stata determinata per formulare la diagnosi di recidiva meningea di LNHB in assenza di chiari segni clinici e di significative alterazioni chimico-fisiche del LCR.

Hegde U, Filie A, Little RF, et al. High evidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* 2005;105:496-502.

P212

UTILITA' DEI MARCATORI CD14 E CD11b NELLA VALUTAZIONE CITOFLUORIMETRICA DELLE MONOCITOSI

F. Bottan, F. Pauselli, L. Pichi, M. Gaudio

U.O.C. Patologia Clinica, A.O. San Giovanni Addolorata, Roma

Scopo dello studio: Nel corso della maturazione delle cellule monocitarie la comparsa pressoché contemporanea del CD14 e del CD11b segna il passaggio dal promonocita al monocita maturo. Nelle LAM monocitico/monoblastiche talvolta è possibile constatare l'espressione dissociata dei suddetti marcatori.

Materiali e metodi: Nel nostro laboratorio viene utilizzata per la valutazione preliminare delle monocitosi una combinazione anticorpale a sei colori finalizzata a evidenziare l'espressione dei seguenti marcatori: CD45 CD14 CD11b CD33 CD64 HLA-DR. Tale combinazione permette di distinguere agevolmente monociti maturi caratterizzati dall'immunofenotipo CD45+ HLA-DR+ CD33+ CD64+ CD11b+ CD14+ da precursori monocitari CD45+ HLA-DR+ CD33+ CD64+ CD11b- CD14-.

Risultati: Dai risultati è emerso un caso di leucemia acuta monoblastica. Sono ben distinguibili una popolazione di monociti maturi CD14+CD11b+ e una popolazione di monoblasti atipici CD14-CD11b+.

Discussione e conclusioni: L'espressione dissociata di CD11b e di CD14 è un LAIP caratteristico talvolta constatabile nelle LAM monocitico/monoblastiche e utilizzabile sia per la diagnosi iniziale che per la valutazione della MMR.

Olaru D, Campos I, Flandrin P, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: implication for the detection of LAIPs. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:17-24.

P213

HEVYLITE™ IgM κ AND IgM λ ASSAY IN MONITORING A PATIENT WITH WALDENSTROM'S MACROGLOBULINEMIAJ. Intra¹, F. Cappellini¹, C. Sarto¹, P. Brambilla²¹S.C. Analisi Chimico Cliniche Desio/Carate/Giussano, AO di Desio e Vimercate (MB)²S.C. Analisi Chimico Cliniche Desio/Carate/Giussano, AO di Desio e Vimercate (MB), Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano – Bicocca, Monza (MB)

Introduction: Since IgM monoclonal component is difficult to detect and to measure by capillary electrophoresis (CE), due to its structural characteristic and self-aggregation, and immunofixation (IFE) is not a quantitative technique, we are evaluating the Hevylite™ assay (The Binding Site, UK), a turbidimetric method to quantify the heavy-light paired immunoglobulins to investigate in detail patients with serum IgM monoclonal protein (MP).

Case report: In this report, we describe the case of a 73 old man with an apparent small IgM κ MP, identified by IFE in 1990. During the course of time, the serum MP separated by CE did not vary, maintaining levels from 2.1 to 3.1 g/L. Cryoglobulins and Bence-Jones protein were absent. In 2006, bone marrow examination revealed the progression of MGUS in Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) by the presence of 20% lympho-plasmacytoid cells. Serum immunoglobulin concentrations were all abnormal; since 1990, IgA and IgG were below the minimum reference values: 50 mg/dL, 750 mg/dL respectively, and IgM were 9-fold higher than the reference value (RV): 1800 mg/dL. Serum free light chains (FLC) showed modestly altered κ FLC and normal λ FLC values: about 46 and 11 mg/L, respectively (RV: κ FLC 3.3-19.4 mg/l; λ FLC 5.71-26.3 mg/l, and about 3.00 κ/λ ratio (RV: 0.26-1.65). We applied Hevylite™ IgM κ and IgM λ assay to monitor the sera of this patient collected throughout the last three years. Both IgM κ and IgM λ showed altered levels: from 2.20 to 3.16 g/L, and from 0.035 to 0.025 g/L, respectively (RV: IgM κ 0.33-1.54 g/l, IgM λ 0.20-1.10 g/l), whose sum corresponded to high IgM total concentrations. IgM κ /IgM λ ratios were abnormal, increasing from 89 to 114 much higher than the RV: 0.81-2.52.

Conclusions: The introduction of Hevylite™ assay allowed to monitor this patient quantifying the high stable concentration of IgM κ associated to a slowly implemented suppression of uninvolved IgM λ . This might support information of WM progression, in contrast with CE, IFE and FLC.

Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. Clin Chem 2009;55:1646-55.

P214

UN CASO DI LINFOCITOSI: INDAGINE IMMUNOCITOFUORIMETRICA

R. Pica, F. Pauselli, M. Gaudio

U.O.C. Patologia Clinica, A.O. San Giovanni Addolorata, Roma

Scopo dello studio: Viene riportato un caso di Linfocitosi (6990/uL) relativo ad un paziente di 75 anni ricoverato nel reparto di Neurologia dell' Ospedale San Giovanni di Roma nel febbraio 2015.

Materiali e Metodi: L'analisi è stata eseguita in citometria a flusso multiparametrica, impiegando anticorpi monoclonali specifici coniugati a fluorocromi e citofluorimetro FACS Canto II a 6 color della Beckton Dickinson.

Risultati e Conclusioni: Dall'analisi della tipizzazione linfocitaria eseguita sul campione di sangue periferico con software CANTO le popolazioni B linfocitaria, CD19+, e quella NK, CD16-CD56+, risultavano nell'ambito della norma, mentre i linfociti T CD3+ erano significativamente aumentati (6571uL, 94% dei linfociti totali); per di più la somma dei CD3+ CD4+ (2167/uL, 31%) e dei CD3+ CD8+ (1188/uL, 17%) risultava inferiore ai linfociti T totali, indicando la presenza di una popolazione di linfociti T doppio negativi consistente (3215/uL). E' stato quindi necessario impostare una indagine più approfondita per definire meglio il fenotipo di tale popolazione, valutando l'espressione dei principali antigeni comuni marcatori di linea T.

L'analisi dei grafici ottenuti con software DIVA ha portato alla identificazione dell'immunofenotipo CD3+high, CD2-CD4-, CD8-, CD5-, CD7+, TCR alfa-beta-, TCR gamma-delta+ e tale popolazione, atipica, è stata interpretata di sospetta natura clonale.

L'esame gold standard per la diagnosi di clonalità è lo studio completo del riarrangiamento del gene per il recettore dell'antigene (aplotipi v-beta), disponibile solo in pochi centri diagnostici.

Da una indagine anamnestica retrospettiva è emerso che il paziente aveva subito in passato una splenectomia su indicazione del medico ematologo nel sospetto di un linfoma.

Il riscontro della espansione di una popolazione di linfociti T gamma-delta atipici per assenza di espressione di alcuni dei principali marcatori della linea di appartenenza costituisce una conferma della presenza di un linfoma T epatosplenico.

Harrison, Fauci, Braunwald, et al. Principi di Medicina Interna. Casa Editrice Ambrosiana. Ed. XVIII, 10/2012.

P215

FONDAPARINUX, PF4-HEPARIN AND ANTIPHOSPHOLIPID (APL) ANTIBODIES: A DIAGNOSTIC DILEMMA

B. Montaruli¹, P. Sivera², B. Beer³, D. Cosseddu¹, M. Massaia², A. Cottino⁴, M. Migliardi¹

¹Laboratory Analysis Department, AO Ordine Mauriziano, Torino

²Haematology Department, AO Ordine Mauriziano, Torino

³General Medicine II, AO Ordine Mauriziano, Torino

⁴Emergency Department, AO Ordine Mauriziano, Torino

To date, there have been very few reports of HIT with fondaparinux, moreover patients with aPL have been reported with positive tests for PF4-heparin antibodies by antigen assay. Whether such patients can be treated with heparin is a dilemma. Here we present a case of a patient treated with fondaparinux and combined HIT and aPL.

An 89-year-old aPL positive woman with bleeding skin diathesis presented to the emergency department on day 7 of fondaparinux therapy started because of lower right limb occlusive DVT. Her platelet count had decreased from 139 to 2 x 109/L and Hb was 8.9 g/dl. The patient suspended fondaparinux and received 3 units of platelets pool plasma and 1 mg/kg/die of prednisone. Given her decline in platelets a clinical suspicion of HIT was supposed. Her IgG anti-PF4/heparin ELISA was positive. Positivity confirmed with high-dose heparin neutralization studies and with two functional assays Heparin Induced Platelet Aggregation and Rapid Aggregation Test. Prednisone was discontinued and alternative anticoagulation with Rivaroxaban was initiated. Over the next few days, her platelet count rose to 69 x 109/L, and the patient was discharged home in good condition without signs of hemorrhage. She was readmitted to emergency department after 3 weeks because of severe thrombocytopenia, treated again with platelets pool plasma and prednisone, and anticoagulation with Warfarin was initiated.

The risk of HIT is negligible with fondaparinux and a small but significant percentage of aPL positive patients have anti PF4 antibodies, often in the absence of clinical HIT or recent heparin exposure. Although some of these antibodies may be directed against PF4 alone, in agreement with previous studies we found that our aPL positive patient do indeed have true autoimmune heparin dependent antibodies. The relevance of autoimmune anti-PF4-heparin antibodies in aPL patients to the development of HIT remains to be further elucidated.

P216

IL RUOLO DELLA MEDICINA DI LABORATORIO NELLA DIAGNOSI IN AREE PERIFERICHE: ANALISI DI UN CASO DI BORRELLIOSI DI LYME

M.R. Cavallo¹, V. Granero¹, E. Zanotto¹, E. Peyronel¹, M. Salvai²

¹S.C. Lab. Analisi, Ospedale di Pinerolo, ASL TO3

²S.C. Anestesia e Rianimazione, Ospedale di Pinerolo, ASL TO3

Introduzione-scopo: La malattia di Lyme (LD), malattia infettiva trasmessa da vettori quali zecche del genere Ixodes, è causata dalla spirocheta *Borrelia burgdorferi*. Il segno più comune di LD è l'Eritema Migrans (EM), che, di solito, si presenta come una piccola papula eritematosa, e appare nel sito dove è avvenuta la puntura della zecca 1-2 settimane più tardi e in seguito s'ingrandisce.

Riportiamo il nostro primo caso di LD: evento prontamente gestito grazie alla sinergia tra il microbiologo, che ha eseguito la diagnosi, e il clinico, che ha trattato la paziente (PZ).

Descrizione caso clinico: Alla fine di agosto 2014, una donna caucasica italiana di 61 anni si presenta nel nostro laboratorio (LAB) per un EM tipico; la PZ dichiara di essersi recata nei boschi della Val Chisone, di esser stata punta da una zecca e di aver manifestato, dopo 14 giorni, febbre accompagnata da stanchezza, mal di testa e artralgia alla caviglia destra. Esame Obiettivo: presenza di lesione eritematosa modicamente infiltrata a livello del collo ad estensione centrifuga in sede di pregressa puntura di zecca. Presenza di lesioni simili alla precedente a livello della natica e del polpaccio di destra, comparse successivamente alla prima rotondeggianti ed eritematose con infiltrazione spiccata a carico del polpaccio. Il paziente è stato trattato con doxiciclina da assumere per via orale: 200 mg per i primi 5 giorni; 100 mg per altri 10 giorni, a causa di nausea e mal di stomaco quali effetti collaterali.

Risultati: La diagnosi è stata fatta per la presenza di EM. Inoltre, il clinico ha richiesto i seguenti esami:

Emocromo: (impedenziometria); WBC: 3.700/μL (formula normale); RBC: 4.490.000/μL; Hb: 13.6 g/dL; PLT: 259.000/μL;

CRP (turbidimetria): 0.26 mg/dL;

VES (fotometria capillare): 17

Sierologia:

IgM B.burgdorferi (CLIA): 190.00 UI/mL

IgG B.burgdorferi (CLIA): 48.06 UI/mL

Western Blot: IgG e IgM POSITIVO.

Discussione: Questo caso sottolinea l'importanza svolta dagli specialisti in medicina di LAB, dal punto di vista professionale e di relazione con il paziente e di come sono indispensabili per la diagnostica microbiologica sul territorio, soprattutto in un ospedale di primo livello come il nostro.

Shapiro ED, et al. Lyme Disease. N Engl J Med 2014;370:1724-31.

P217

UNKNOWN ORIGIN ANEMIA: SOMETIMES IT DOESN'T TAKE MUCH...

S. Valenti, G. Gardini

Laboratorio a Risposta Rapida, Ospedale S.M. delle Croci, Ravenna, AUSL Romagna

Background: In AUSL Romagna Laboratories we evaluate Complete Blood Count (CBC) using a Expert System (ES) that displays numerical results, analytic "flag", instrumental alerts, histograms, cytograms.

So from any system position it is possible a safe remote selection of samples to be verified by Optical Microscope (OM). In Hospital Laboratories (LRR) selection is done by experienced professionals and not by ES.

Materials and Methods: Sysmex-Dasit hematology analyzers are selected according to workload: XE-2100, XT-2000, XS-1000; ES is a collaboration between Dasit, software-house Noemalife and Laboratory professionals.

Results: Sample analysis of a 76 years old woman who came to Emergency Room for unknown anemia shows: Hb 6.5 g/dl; MCV 108 fl; WBC 8.400/ μ L; creatinine 1.7 mg/dl. It has been selected for peripheral blood smear and microscopic analysis shows massive erythrocyte rouleaux, few plasma cells and erythroblast.

Patient doesn't live in Romagna and doesn't have any previous laboratory test except a positive Coombs for blood sacks assignment. Laboratory doctor measures Total Protein. This test can not be required by Emergency Room but is available in LRR and confirms the high level of likely Monoclonal Component (MC) suspected: PT 174 g/L. He calls the Clinician that suspects a Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) related to connective disease and applies to ANA reflex test. Doctors decide together to do serum protein electrophoresis, immunofixation, haptoglobine, reticulocytes that confirm AIHA diagnosis related to a Immunoproliferative disorder not yet diagnosed.

Discussion and conclusions: It is rare to diagnose an advanced Myeloma like this: MC IgG/ λ 119 g/L and 75% bone marrow plasma cells. The family doctor says that he used to do blood tests for diabetes and for non investigated anemia. Previous CBC have never been verified using peripheral blood smear and serum protein electrophoresis have never been required. Not always "Less is better".

P218

DETECTION AND QUANTIFICATION OF BENCE JONES PROTEIN (BJP) IN A SUBJECT WITH MONOCLONAL GAMMOPATHY OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE (MGUS) AND AMYLOIDOSIS AL: COMPARISON BETWEEN ANALYTICAL METHODST. Troiano¹, R. Ria², C. Capobianco¹, T. De Chirico¹, A. Fiore¹, R. Luce¹, F. Di Serio¹¹*Department of Clinical Pathology, University Hospital of Bari*²*Department of Biomedical Sciences, Section of Internal Medicine "G. Baccelli"*

Background: BJP detection and quantification include two distinct tests: urine immunofixation (u-IFE) and urinary protein electrophoresis followed by densitometric scan of the BJP peak, determination of the ratio of the BJP peak percentage to the total protein and the diuresis allows to estimate the amount of the BJP in 24 hours.

Aim of the study: To assess the analytical performance of high resolution agarose gel technique (Hydragel HR Sebia) and the new capillary electrophoresis technique (Capillarys Urine Sebia) for measuring BJP in this patient. Materials and methods: 83 yrs old woman with an IgG lambda MGUS, chronic renal failure (CRF) and suspected Amyloidosis AL. At the first observation, u-IFE (Sebia) revealed the presence of an IgG lambda; the results of the blood tests were the following: proteinuria=2978 mg/24h (urine volume 2750ml/24h); kFLC=53 mg/L; λ FLC=985 mg/L; k/ λ ratio=0.05; proBNP=531 pg/mL.

In order to verify the suspected diagnosis, a 24h urine sample was processed both by HR electrophoresis on agarose gel and by capillary electrophoresis with the purpose of detecting and quantifying the possible presence of monoclonal free light chains. The same sample was then analysed by immunotyping (Capillary IT Sebia).

Results: Urinary electrophoresis on HR agarose gel allowed to quantify the IgG lambda MC (832 mg/24h); the capillary method also highlighted the presence of a lambda BJP (166 mg/24h). The lambda BJP was then confirmed by the result of the immunotyping.

Conclusions: The results obtained by the capillary technique correlated with the clinical suspicion of amyloidosis AL and the positive result of the abdominal fat tissue aspiration confirmed the diagnosis.

Our study suggests that the capillary method displays a higher resolution compared to the HR agarose gel electrophoresis method; in particular, in case of a low concentrated BJP or a BJP hidden by the complete immunoglobulin, this technique could be of help in the diagnostic process of plasmacellular dyscrasias.

1. G. Merlini. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012;36:25-28.

P219

MILD ISCHEMIC STROKE AFTER THE OMISSION OF A SINGLE DOSE OF DABIGATRAN

L. Ruocco¹, I. Scatagliani¹, G. Molini², T. Pavia¹, M. Trottni², A. Faleburle³, A. Aita², G. Murdolo², G. Pellegrini¹, P. Verdecchia²

¹Unità Operativa Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ambulatorio Antitrombosi, Azienda Ospedaliera Pisana, Pisa

²Struttura Complessa di Medicina, Ospedale di Assisi, Assisi

³Cardiologia e Fisiopatologia Cardiovascolare. Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia

Aim: Dabigatran Etextilate (DE) was the first oral direct thrombin inhibitor approved for the prevention of stroke and systemic embolism in patients with non-valvular atrial fibrillation (AF). One of its main advantages relies on predictable pharmacokinetics allowing a fixed dosage for each patient. We discuss a case of clinical and pharmacologic resistance, challenging current guidelines that do not recommend laboratory blood monitoring after dabigatran use.

Methods: Levels of DE plasma concentrations were determined on citrated plasma with Hemoclot® thrombin inhibitor test and Haemosys®ecarin chromogenic assay (ECA), according to international consensus on laboratory assessment of non-vitamin K oral anticoagulants (NOACs). All other laboratory evaluations were performed according to each manufacturer's specification.

Results: We report a case of a young obese patient with permanent atrial fibrillation who developed a mild ischemic stroke few hours after the omission of a dose of DE. Trans-esophageal echocardiography showed marked spontaneous contrast in the left atrium and left atrial appendage, a condition which may have contributed to the development of the stroke. A subsequent study of pharmacokinetic response to DE on the patient, showed low plasma levels of DE 2 hours (38 ng/ml) and 12 hours (2 ng/ml) after the drug intake. Of note, blood analysis revealed glomerular hyper-filtration, with estimated glomerular filtration rate of 185 ml/min.

Conclusions: To our knowledge this is one of the few reported cases of clinical and pharmacologic resistance to DE in non-valvular AF. Nevertheless, in our opinion, these cases challenge the concept of a universal response to DE and rise concerns on the absence of recommendation of laboratory monitoring after DE use, specifically in patients with extreme pharmacokinetic profiles.

1. Gosselin RC, Adcock DM. Assessing nonvitamin K antagonist oral anticoagulants (NOACs) in the laboratory. *Int J Lab Hematol* 2015;37(Suppl 1):46-51.

2. Australian Government alert on NAOCs, June 2015. www.tga.gov.au/alert/new-oral-anticoagulants-apixaban-eliquis-dabigatran-and-rivaroxaban-xarelto.

P220

CERVICAL FRACTURE AS CLINICAL ONSET IN A CASE OF MULTIPLE MYELOMA

B. Lo Sasso¹, A. Scavuzzo², E. Pappalardo², S. Milano², L. Agnello¹, L. Calvaruso¹, G. Bivona¹, C. Bellia¹, M. Ciaccio¹

¹Sez. Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dip. di Biopatologia e Biotecnologie Mediche - DiBiMed - Università degli Studi di Palermo, Italy

²U.O.C. Medicina di Laboratorio - CoreLab, A.O.U.P. "P. Giaccone", Palermo, Italy

Background: Multiple Myeloma (MM) is a clonal disorder characterized by proliferation and accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. Its annual incidence is 6/100,000 in western countries and in Italy are reported about 2,000 new cases a year. The median age at diagnosis is 65 years (1). Bone disease occurs in approximately 80% of patients with newly diagnosed MM, and in 70% of the case bone pain is the first symptom to be reported at disease onset. Pathological fractures, osteolysis, osteoporosis can severely impair patients quality of life and reduce survival. Spine is the bone site that is most frequently affected by MM-related lesions. The cervical spine is the least common site of disease involvement.

Clinical case: A 60-year-old female patient was referred to the Department of Neurosurgery of the General Hospital "P. Giaccone" in Palermo, for neck pain, paresthesia and weakness of lower limbs. Her medical history reported the presence of high blood pressure, dyslipidemia, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Arnold Chiari Syndrome type II. A magnetic resonance imaging scan showed a pathological fracture of the sixth cervical vertebra (C6). The results of the laboratory tests and the bone marrow examination led to a diagnosis of IgA κ MM (Durie Salmon stage IIIA). The patient underwent a cervical arthrodesis and started systemic Bortezomib-Thalidomide-dexamethasone (VTD) combination chemotherapy. During chemotherapeutic treatment the patient was recovered in Neurosurgery Department for hyposthenia of lower limbs caused by bone lesion in L4 and underwent a vertebroplasty of L4-L5. After 4 VTD cycles, the patient was dismissed showing a very good partial remission (VGPR). Later the patient subjected herself to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) obtaining a complete remission.

Discussion: Bone dissolution caused by MM may lead to pathological fractures, osteopenia, or lytic lesions. We report a clinical case of MM in which the fracture of cervical spine represents the clinical onset. Indeed, this clinical presentation is not common in this type of monoclonal gammopathy. This case underlines the importance of suspecting MM in all cases of compromised bone.

1. Rajkumar SV. *Am J Hematol* 2014;89:999-1009.

P221

FREE LIGHT CHAIN IN A CASE OF CHEMIOTHERAPY RESISTENT MULTIPLE MYELOMA

B. Lo Sasso¹, A. Scavuzzo², E. Pappalardo², S. Milano², L. Agnello¹, L. Calvaruso¹, G. Bivona¹, C. Bellia¹, M. Ciaccio¹

¹Sez. di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi, Università degli Studi di Palermo, Italy

²U.O.C. CoreLab, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico, Palermo, Italy

Background: Multiple Myeloma (MM) is the most common type of primary bone cancer and accounts for 1.5% of all cancers. The average age at diagnosis is 65 years (1). Bone disease occurs in approximately 80% of patients with newly diagnosed MM, and in 70% of the cases bone pain is the first symptom to be reported at disease onset. Free light chain (FLC) assay is important in the diagnosis, monitoring and management of MM; particularly, an abnormal ratio indicates a substantial risk of progression of disease.

Clinical case: A 70-year-old female was admitted to the Department of Hematology of the General Hospital "P. Giaccone" in Palermo, with back pain. Medical history reported presence of type 2 diabetes, high blood pressure and chronic kidney failure. Capillary zone electrophoresis (CZE) (β_2 41.9 g/L [normal range 2.0-5.3 g/L]), immunofixation electrophoresis (IFE) and bone marrow biopsy led to diagnosis of IgA κ MM (Durie Salmon stage II). At the same time she was admitted to neurosurgery for a collapse in somatic D9. Patient underwent a vertebroplasty and started systemic Bortezomib-Melphalan-Prednisone (VMP) chemotherapy. After 4 cycles therapy, showed a very good partial remission (VGPR) but treatment was interrupted due to toxicity. Subsequently the patient showed a failure of L4 and was treated with vertebroplasty. Thereafter Lenalidomide-dexamethasone therapy (Rd) was initiated but on the fourth day for adverse reaction was suspended. Currently the patient is having systemic Bortezomib-Dex (VD) chemotherapy. sFLC assay (FREELITE Lambda for Siemens PROSPEC - The Binding Site) showed following results: κ sFLC 54.2 mg/L (normal range 3.30-19.40 mg/L) λ sFLC 8.31 mg/L (normal range 5.71-26.30 mg/L) and κ/λ ratio 6.52 (normal range 0.26-1.65) and a β_2 component 4.8 g/L. After 5 cycles of VD treatment, the CZE shows a β_2 component 13.59 g/L, and evaluation of sFLC highlighted a substantial increase of kappa light chain with κ/λ ratio 257.6.

Discussion: FLC is a more sensitive test in response to treatment compared to CZE or IFE. In this clinical case, evaluation of sFLC ratio might be useful in early identification of poorly responding patients, in contrast with routinely laboratory findings.

1. Rajkumar SV. Am J Hematol 2014;89:999-1009.

P222

UN CASO DI LEUCEMIA LINFOIDE ACUTA IN ETA' PEDIATRICA: RUOLO DEL SISTEMA ESPERTO HEMALINK NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO

S.T. Caravetta¹, P.L. Bacchini², G. Fragni³, P. Lazzeroni³, G. Previtali¹, F. Savina³, A. Tosi¹

¹U.O. Patologia Clinica, AUSL di Parma, P.O. Fidenza

²U.O. Pediatria, AUSL di Parma, P.O. Fidenza

³U.O. Oncoematologia Pediatrica, A.O.U. di Parma

Caso clinico: Beatrice ha quattro anni e si presenta al Pronto Soccorso del nostro Ospedale alle ore 21.35 con codice verde. La bambina esegue il triage che registra da 2-3 giorni la comparsa di tumefazione linfonodale bilaterale, ecchimosi lieve retroauricolare destro atraumatica e lieve iperpiressia.

Viene vista dal Pediatra che prescrive gli esami ematici ed ecografia del collo. Gli esami ematici non presentano anomalie della coagulazione né alterazioni del quadro elettrolitico e della funzione renale (creatinina = 0.40 mg/dl) ed epatica. L'esame emocromocitometrico eseguito su ADVIA 2120 mostra: Leucocitosi (21.17x10³); linfocitosi (18.8 x10³), anemia (Hb 9.6 g/dL); piastrinopenia (piastrine 31x10³ / μ l); neutropenia (neutrofili 1.46x10³). Il citogramma valutato con sistema esperto HEMALINK (Siemens) mostra nella finestra della finestra della perossidasi una voluminosa popolazione di cellule perossidasi negative di dimensioni eterogenee che formano un raggruppamento affusolato fino al limite superiore dell'asse delle y con elevata percentuale di LUC (12%). La notevole percentuale di LUC ha determinato la comparsa dell'allarme " atipici". In base a questa lettura del citogramma è stato allestito un vetrino per l'esame morfologico. Le cellule riscontate alla periferia dello striscio erano linfoblasti di dimensioni eterogenee, elevato rapporto nucleo-citoplasma e circa il 20% di linfociti maturi. Gli esami virologici, eseguiti in un secondo momento, escludono un'infezione in atto, mentre l'LDH risulta elevato: 1555 U/L (V.R. = 615 U/L). In base a questi dati viene posta la diagnosi di linfadenopatia di ndd e la bambina inviata al reparto di Oncoematologia Pediatrica di Parma per l'approfondimento diagnostico. La diagnosi conclusiva risulta compatibile per LLA pre-B (CALLA positiva).

Conclusioni: L'esordio di leucemia linfocite acuta era, in questo caso, paucisintomatica legata alla presenza di una linfadenopatia e modesta iperpiressia. La presenza in Laboratorio di un sistema di valutazione dell'emocromo come HEMALINK ha permesso ad un operatore esperto di valutare l'esame emocromocitometrico come critico. La diagnosi precoce è di fondamentale importanza per l'inizio della terapia ed evitare ritardi terapeutici che a volte possono compromettere la prognosi.

P223

**ALGORITMO DIAGNOSTICO PER MGUS
EMATOLOGIA-MEDICINA GENERALE-TERRITORIO
CON STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO
PROGNOSTICO ATTRAVERSO IL DOSAGGIO DELLE
CATENE LEGGERE LIBERE SIERO**

F. Simonetti¹, A. Stefanelli¹, E. Baccelli¹, M. Rousseau², R. Diodati³, G. Deri³, D. Catelli⁵, D. Taccola⁴, P. Lambelet⁴

¹UOS Ematologia, Ospedale Versilia

²UO Ematologia Universitaria, Pisa

³UOC Laboratorio Analisi, Ospedale Versilia

⁴UOC Medicina, Ospedale Versilia

⁵PUA Casa della Salute Ex Tabaracci, USL12 Viareggio

Premessa: La MGUS è una patologia clonale prematurale presente nel 4,2% della popolazione generale caucasica associata ad un rischio di progressione maligna del 1% per anno. La diagnosi è generalmente occasionale presso l'ambulatorio di medicina generale o quello di ematologia.

Scopo: evidenziare i pazienti con MGUS ad alto rischio di trasformazione maligna rappresenta l'obiettivo primario nella gestione delle Gammopatie Monoclonali. Presso l'UOS di Ematologia dell'Ospedale Versilia è in atto una collaborazione tra ematologi, medici di medicina generale e distretto territoriale per la diagnosi e la stratificazione prognostica delle MGUS attraverso un'algoritmo che prevede il dosaggio delle catene leggere libere sieriche (Binding Site).

Materiali e Metodi: i pazienti che presentano una proteina M vengono sottoposti agli esami di laboratorio previsti nell'algoritmo tra cui l'immunofissazione siero per identificare il sottotipo e la quantità di CM e il dosaggio delle catene leggere libere sieriche. In base alla stratificazione del rischio proposta dalla Mayo Clinic, identifichiamo come "alto rischio di progressione" i pazienti con MGUS che presentano almeno uno tra i seguenti: 1-Proteina M >1.5 g/dl; 2-Proteina M non IgG; 3-Rapporto catene leggere libere siero alterato.

Risultati: I pazienti con MGUS identificati come alto rischio vengono inviati dal medico di medicina generale presso l'Ematologia per studio completo della gammopatia monoclonale e seguono un follow up più ravvicinato. I pazienti a rischio basso seguono un follow up ogni 1-2 anni presso l'ambulatorio di medicina generale. Il ruolo del Distretto Territoriale è quello di raccogliere i dati dei pazienti MGUS con finalità sia statistiche sia assistenziali.

Conclusioni: l'algoritmo diagnostico, che utilizza il dosaggio delle catene leggere libere siero, ha lo scopo di evidenziare le MGUS ad alto rischio garantendo una diagnosi precoce di emopatia neoplastica. Inoltre permette una stretta collaborazione tra ematologi, laboratoristi, medici di medicina generale e del distretto territoriale.

P224

**USEFULNESS OF THE APPLICATION OF RT-PCR TO
MATRICES OTHER CSF. DIAGNOSIS OF BACTERIAL
MENINGITIS CAUSED BY N. MENINGITIDIS: A CASE
REPORT**

L. Bianchi, S. Donati, Z. Napoli, R. Giannecchini, R. Lari

U.O. Laboratorio Analisi, Ospedale S. Jacopo, Pistoia

Background: Real Time (RT)-PCR has still a key role in viral and bacterial meningitis diagnosis on cerebrospinal fluid (CSF) because it is a fast and an accurate method. Technologies like FilmArray (FAT) are effective methods considering easy execution and rapidity, but they aren't still validated on CSF. This clinical case underlines the RT-PCR importance performed on different biological matrices as blood.

Case report: A white female 65 years old, immunocompromised, with lumbar osteoarthritis and vertebral surgical stabilization arrived to the first aid with a flu suspect. In triage the patient showed: high fever (38°C), sore throat, otalgia and labored breathing. Biochemical, coagulation tests and complete blood count (CBC) were performed including procalcitonin (PCT, ng/ml), C reactive protein (CRP, mg/dL) and blood culture (BC). Within 2 hrs patient got worse and she was intubated and admitted to intensive care. After 12hrs, due to a further worsening and a failure in performing lumbar puncture, RT-PCR was performed on blood to detect bacteria/viruses (Eurospital/Biomerieux). Cultural test on endotracheal aspirate (EA) was performed. At the hospitalization laboratory parameters were: platelets=83.000/mm³; WBC=2.300/mm³; neutrophils=1.180/mm³ (51.6%); Aptt INR=1.30%; D-dimer=1340 µg/IFEU CPR=27.51; PCT=4.8. After 12-24hrs: platelets=55.000/mm³; WBC=4.000/mm³; neutrophils=3.040/mm³ (75,4%); Aptt INR=1.56%; D-dimer=1.530 µg/IFEU; CPR=27.51; PCT=11.7. RT-PCR tests performed on blood detected N. meningitidis at 31 Cycle Threshold (CT) while FAT didn't confirmed RT-PCR result (due to its less sensitivity). RT-PCR test confirmed N. meningitidis positivity even on EA (CT = 28). After 96hrs BCS were negative.

Conclusions: In case of meningitis/sepsis suspect it is important to include in management protocols a CBC for further molecular tests. FAT is helpful in urgency management of meningitis (Bianchi et al., 2014) but, for lower loads (CT>28-31) only RT-PCR can exclude meningococcal meningitis. Primary infection site identification and specific matrices request are very important in detecting responsible pathogens of sepsis allowing to confirm diagnosis and for patient "outcome". Bianchi L, Napoli Z, Donati S, et al. Clin Chem and Lab Med 2014;52:E393.

P225

UN CASO DI EMOFILIA ACQUISITA

C. Dodaro¹, R. Albisani¹, A. Amendola¹, G. Mirabelli¹, M. Vitiritti¹, M. Miraglia¹, B. Mancuso¹, C. De Rosa¹, R. Pellegrini², S. Vaccarella¹

¹U.O.C. Laboratorio Analisi Cliniche, Biomolecolari e Genetica A.O. Cosenza

²U.O.C. Medicina Valentini A.O. Cosenza

Introduzione: L'emofilia acquisita è una patologia rara caratterizzata dall'insorgenza di gravi manifestazioni emorragiche, con incidenza tra 0,2 e 1 caso/milione/anno, che presenta una distribuzione bifasica dell'età di insorgenza con un primo picco tra 20 e 30 anni e un secondo intorno ai 60-80 anni. E' caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi diretti contro il fattore VIII circolante, che possono indurre sanguinamento spontaneo in soggetti senza una precedente storia di disordini emorragici. Le emorragie sono spesso gravi e interessano i tessuti molli e le mucose, mentre gli ematriti sono più rari.

Caso clinico: Un paziente di anni di anni 82 si recava al pronto soccorso del nostro Ospedale per la comparsa di una profonda astenia e contrazione dei diuresi. Gli esami ematochimici eseguiti evidenziavano una grave anemia, motivo per cui veniva ricoverato con diagnosi di "Anemia in paziente con IRC. Progresso ictus cerebri". Durante la degenza veniva riscontrato un prolungamento dell'aPTT. Il test della miscela eseguito senza incubazione non correggeva il prolungamento dell'aPTT, deponendo per la presenza di inibitori. Si procedeva pertanto alla determinazione del LAC e degli anticorpi anticardiolipina e anti beta2 glicoproteina 1 che risultavano negativi e in seguito al dosaggio dei fattori della via intrinseca, che evidenziavano una carenza del fattore VIII (6%). Il dosaggio degli inibitori acquisiti del fattore VIII eseguito con metodo Bethesda modificato Nijmegen dava esito positivo essendo stata riscontrata la presenza di 4 U Bethesda /ml. Veniva quindi posta diagnosi di emofilia acquisita, una grave e rischiosa patologia emorragica, che evidentemente grazie al basso livello di inibitori e quindi alla persistenza di una residua attività di fattore VIII non aveva fatto precipitare la già grave situazione anemica del paziente e comunque consigliava un'attenta sorveglianza clinica.

Conclusioni: L'emofilia acquisita rappresenta un disordine emorragico raro ma molto grave. La gestione di tale patologia richiede molta tempestività e competenza diagnostica, per cui è auspicabile che vengano individuati centri regionali attivi sulle 24 h, che provvedano alla valutazione e alla diagnosi di casi selezionati.

P226

UNA "FORTUITA" DIAGNOSI DI LINFOMA DI BURKITT IN PAZIENTE IN FOLLOW-UP PER CMML-1

S. Sale, L. Frascadore, M. Fumi, Y. Pancione, V. Rocco

U.O.C. Patologia Clinica, AORN G.Rummo, Benevento

Da un altro ospedale della nostra città ci perveniva una richiesta per emocromo e immunofenotipo per un paziente di 83a. Il controllo dei dati anagrafici ci suggeriva che il soggetto era in follow up presso il nostro laboratorio da 10 anni per CMML-1, dato questo confermato dall'esame emocromocitometrico e dall'osservazione dello striscio di sangue periferico, che non mostrava alcuna variazione morfologica rispetto ai precedenti controlli, né aumento di blasti mieloidi all'immunofenotipo. L'unica variazione era rappresentata dalla riduzione dell'Hb di 20 g/L. Sulla scorta di queste informazioni e, nonostante il nostro parere negativo, il curante decideva di eseguire comunque un aspirato midollare e ci chiedeva una consulenza per la valutazione morfologica di tale reperto. L'osservazione dello striscio di sangue midollare, oltre a confermare la monocitosi e la displasia granulocitaria, consentiva di riscontrare la presenza di elementi a morfologia blastica di medie dimensioni con citoplasma fortemente basofilo ripieno di vacuoli di dimensioni uniformi che poneva il sospetto di Linfoma di Burkitt. Pertanto, abbiamo richiesto un campione di sangue midollare con lo scopo di tipizzare la suddetta popolazione che è risultata pari al 36% dei WBC, con immunofenotipo: CD19+, CD20+, CD 79b+, CD34- e con clonalità delle Igs di tipo lambda. I blasti mieloidi CD34+, CD13+, CD33+ erano <1%. Solo al terzo controllo, a distanza di 20 giorni dal primo era possibile riscontrare la presenza delle cellule linfomatose anche nel sangue periferico, dove la loro percentuale era <1%. L'età del soggetto, la sua storia clinica, l'assenza di notizie in merito ad alterazioni a carico dei linfonodi, immunofenotipo e morfologia del sangue periferico immutati rispetto ai precedenti controlli, ci avevano portato a ritenere non necessaria l'esecuzione dell'aspirato midollare, nonostante la riduzione dell'Hb. Valutazioni, non sappiamo se di tipo clinico o di natura economica ("D.R.G."), avevano invece comunque spinto il curante all'esecuzione del prelievo midollare che ha consentito di giungere a questa diagnosi "fortuita".

P227

ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME IN A PATIENT WITH MULTIPLE MYELOMA

C. Mandoj¹, M.G. D'Alessandro¹, F. Marchesi², G. Vercillo¹, G. Cigliana¹, L. Autullo¹, P. Cordiali-Fei³, A. Spadea², L. Conti¹

¹Clinical Pathology, Regina Elena National Cancer Institute, Rome

²Hematology and Stem Cell Transplantation Unit, Regina Elena National Cancer Institute, Rome

³Clinical Pathology and Microbiology, San Gallicano Dermatology Institute, Rome

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by arterial and/or venous thrombosis and/or pregnancy morbidity in the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). The presence of aPL in plasma of patients can be detected with either a prolongation of phospholipid dependent coagulation tests (lupus anticoagulant, LA), or with solid phase immune assays (ELISA) against the protein β 2-glycoprotein I (β 2-GPI) or the phospholipid cardiolipin (anti- β 2-GPI and anti-cardiolipin antibodies, respectively) according to the criteria of ISTH (1). Here we describe a case of APS observed in a 42-year-old man with IgG kappa-type multiple myeloma (MM) admitted in the Haematology Unit of Regina Elena National Cancer Institute to receive an autologous stem cell transplant. The patient had past history of psoriatic arthritis and thrombotic event. Laboratory examination on admission showed thrombocytopenia, normal prothrombin time and prolongation of activated partial thromboplastin time (aPTT) (59.5 seconds). Reduced clotting activity of factors IX (28%) was noted. The mix test with normal pooled plasma showed the presence of circulating anticoagulant. A dilute Russell's viper venom time test and Silica Clotting time test performed in parallel at low (screen) and high (confirm) phospholipid concentrations were used to confirm the presence of LA. IgG and IgM anti-cardiolipin and anti- β 2-GPI antibodies measured by standardized ELISA were strong positive. After the diagnosis confirmation, the patient was treated with melphalan, dexamethasone and heparin. During the treatment, aPTT was observed to normalize. To date, there are very rare reports of APS in patients with MM, the presence of aPL may increase thrombotic risk in these patients.

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295–306.

P228

A CRYPTIC CHROMOSOMAL REARRANGEMENT OF THE FGFR1 GENE IN A CASE OF MYELOPROLIFERATIVE SYNDROME 8P11

I. Caliendo¹, F. Rivellini², C. Fabbriatore³, M. Ergoli¹, C. Califano², P. Danise¹

¹U.O.D. Diagnostica Ematologica, P.O. "A. Tortora", Pagani (SA)

²U.O.C. Oncoematologia, P.O. "A. Tortora", Pagani (SA)

³Dipartimento di Medicina e Biotecnologie Mediche, Università Federico II (Na); U.O.D. Diagnostica Ematologica, P.O. "A. Tortora" Pagani (SA)

The 8p11 Myeloproliferative Syndrome (EMS) is a rare disease characterized by myeloproliferative neoplasm associated at eosinophilia and T or B lymphoblastic lymphoma/leukemia. EMS is defined by molecular alteration of FGFR1 gene, located at chromosome 8p11-12, involved in a chromosomal translocation or insertion. We report a case of a 57 year-old man arrived at our center in July 2014. The patient is hospitalized for the presence of laterocervical and inguinal lymphadenopathy. The hematological examination revealed neutrophilic leukocytosis, monocytosis and eosinophilia. Morphological and immunophenotypic studies of bone marrow aspirate and bone marrow biopsy showed the presence of myeloproliferative neoplasm and lymphoproliferative B disease. By histological study of inguinal lymph node was found a picture of T-lymphoblastic lymphoma/leukemia. Bone marrow conventional cytogenetic studies showed: 46,XY[6]/46,XY,t(8;13)(q24;q12)[2]/46,XY,t(8;13)(q24;q12),der(5),del(9)(q22)[2]. The short arm of chromosome 8 appeared not involved in translocation, but the FISH analysis, performed with the FGFR1 break apart probe, revealed disruption of FGFR1 gene. FISH was performed with two markers, D8S2331 (5' to FGFR1) and WI-16234 (3' to FGFR1) labeled with red and green fluorescence, respectively. In normal metaphase cells two signals yellow, determined by fusion of sequence 5' and 3' to FGFR1, were observed on chromosome 8. In metaphase cells from the patient, carried a t(8;13) translocation, only one signal yellow was detected on the normal allele, whereas one green and one red signal indicate the translocation of the other allele. The signal patterns of FISH analysis showed the implication of the FGFR1 gene in a cryptic chromosomal rearrangement. Our case confirmed the critical role of FGFR1 gene in the pathogenesis, diagnosis and future prospects for effective target therapy of EMS.

P229

URINARY AND SERUM ACTIVITY OF LIPASE IN A SUBJECT WITH MACROLIPASEMIA

S. Rapi¹, B. Peruzzi¹, M. Bernardini², D. De Ninno¹, B. Salvadori¹, F. Veroni¹, S. Vecchiarino², A. Maorettoni², M. Fabbri²

¹Laboratorio Generale, Dipartimento Servizi, AOU Careggi, Firenze

²Medicina Interna, Dipartimento Emergenza Accettazione e Accoglienza, AOU Careggi, Firenze

Introduction: Macrolipaseemia is a rare enzyme disorder characterized by altered molecules of lipase, a pancreatic enzyme needed to digest fats, that are abnormally bound with serum antibody proteins.

These antibodies are commonly immunoglobulin. The resulting molecule is too large to be filtered by the kidneys and excreted in the urine, consequently these abnormal molecules build up in the plasma causing sustained elevation of lipase levels called macrolipaseemia.

Low levels of lipase were reported in urine although enzyme activity were preserved.

Material and methods: Laboratory were contacted about the management of a subject of 18 years old with Mediterranean anemia, symptoms of nutritional deficiencies, weight loss, bloating, abdominal pain, steatorrhea, and diarrhea showing increased values of serum amylase, very high values of serum lipase activity (142-171 U/L and 1846, 3304 U/L in different days during hospitalization), normal Immunoglobulin levels without evidence of pancreatic involvements (abdominal echography and TC).

Lipase was measured using LIPL Flex® reagent on Vista system (Siemens Healthcare Diagnostics, U.S.A.). Urine are not included in analytical matrix by manufacturer.

Recovery test and reference range of normal subject in urine was investigated before the investigation of required patient.

Recovery test were performed twice by serial urinary dilutions of serum with high lipase levels. Lipase activity in urine samples, recovered by residual material on routine working flow were investigated in 10 subjects with serum lipase activity, in normal range (73-393).

Results: regression curve of recovery test results $y=1.01x+19$ (Pearson's=0.997)

Urinary values in subjects with normal lipase results <62 U/L.

In subject with macroamilasemia the lipase activity in urine results 13 U/L.

Conclusion: Lipase activity in urinary samples can be measured using commercial methods. Urinary activity of subject were consistent with the presence of macrolipaseemia.

Laboratory should be elaborate protocols to verify methods on different matrix to support unusual clinical presentations.

Arzoglou PL, Féraud G, Métails P. Urinary lipase: properties and value of its determination. *Ann Biol Clin* 1986;44:403-5.

P230

A CASE OF DIFFICULT DIAGNOSIS IN A YOUNG PATIENT WITH REPEATED EPISODES OF SYNCOPE IN WHICH THE METHOD ISAC WAS DECISIVE

D. Debbia, A.T. Scacchetti, T. Tommaso

Dip. di Medicina di Laboratorio - AUSL - AOU, Modena

Background: Diagnosing clearly what he could trigger an allergic reaction is not always an easy task, because this requires a substantial compliance by the patient and acuity by the specialist physician.

Methods: MM male, 27years, after drinking a juice containing orange and carrot reported generalized urticaria without angioedema.

After about twenty minutes, he had a vasovagal episode with nausea and loss of bowel control. He was brought to the emergency department of the hospital. After administration of cortisone symptoms disappear.

In the following days it is evaluated at the Clinic of Allergology of the Policlinico of Modena.

It will scan for IgE-Specifications (sIgE) in serum with method Immucap 1000- (ThermoFisherScientific) directed vs the most common food allergens, and especially to the ingredients present in the juice.

Afterwards it was used a second approach the microarray ISAC (Immuno Sorbent Allergen Chip) that, in the present configuration, consists of 112 different allergens recombinant or purified.

Results: S-IgE with method ImmunoCAP 100: f33 (orange) = <0:10 kUA/l; f31 (carrot) = <0:10 kUA/l; f208 (lemon) = <0:10 kUA/l, along with other food allergens that were all negative.

S-IgE with method ISAC: rPol d 5 (Polistes dominulus; 23 kDa) = 1.8 ISU.

This last value was controlled researching S-IgE vs allergen extract I77 (Polistes dominulus) = 3.2 kUA/l.

Conclusions: MM, in the course of further diagnostic remembers that day syncopal episode was in the hen house in which there was an important nest of wasps; but he did not remember being stung.

The patient tested positive vs I77 + rPol d5. rPol d 5 is a marker for primary sensitization to Vespidae venom, and particularly to Polistes. rPol d 5 is a valuable diagnostic tool to identify whether or not the culprit insect is a Polistes Dominulus when assessing allergic reactions in stung patients. This is of particular clinical value when immunotherapy is considered.

A limit of ISAC is to have positive responses unexpected that involves management problems also forensic. In conclusion, the ISAC turns out to be a very valuable diagnostic test but rather expensive and should be reserved to the specialist who knows all the possible advantages, but also the limits.

P231

UN PARTICOLARE CASO DI IPERBILIRUBINEMIA IN PAZIENTE CON LINFOMA LINFOCITICOA.M. Alfano¹, F. Cantone¹, A. Cuttica², P. Falco², A. Ferrini¹, S. Fiattini¹, C. Foli², R. Freilone²¹Lab. Analisi, Osp. Ciriè, Dip. Patologia Clinica, ASLTO4, Piemonte²S.S. Ematologia, ASL TO4, Piemonte

Donna di 69 anni, con storia di LES oligoespresso, miastenia gravis, ipotiroidismo, emisindrome piramidale, diabete di tipo II. In seguito a riscontro di linfocitosi con evidenza alla tipizzazione linfocitaria di popolazione monoclonale CD5+/CD23+ e multiple adenomegalie in diverse stazioni linfonodali, l'esame bioptico conferma un Linfoma Linfocitico. La paziente inizia dei cicli di terapia con clorambucil. Durante una visita di controllo, viene riscontrata una bilirubina totale aumentata (5.43/ diretta 0.43 mg/dL), transaminasi nella norma, aumento della GGT, senza segni di ittero. In seguito ad ulteriore incremento della bilirubina totale e Hb 10.6, vengono eseguiti gli indici di emolisi, che mostrano un valore di LDH 197 UI/L, aptoglobina 0.9 g/L e test di Coombs diretto dubbio per verosimile cross-reazione anticorpale, con esclusione dell'anemia emolitica. La paziente presenta proteine totali di 10.1 g/L, IgM di 54.4 g/L, con una componente monoclonale IgM K (2.96 g/dL pari a 29.3%). In seguito ad ulteriori incrementi della bilirubina totale (da 13.5 a 14.8 mg/dL) e neutropenia (GB 2670) viene sospesa la terapia citoriduttrice per severa iperbilirubinemia in paziente asintomatica, procedendo ad ulteriori esami per indici di emolisi, che risultavano nella norma. Alla luce di quanto riportato in letteratura¹ e sul foglietto illustrativo del kit da noi usato per la bilirubina totale (Roche Diagnostics) che segnala rari casi di interferenza da paraproteina IgM, viene eseguito il dosaggio della bilirubina con altra metodica (Beckman Coulter) con esito normale della bilirubina totale (0.96 mg/dL), e una bilirubina diretta di 2.63 mg/dl, aumento anomalo già da altri segnalato. Per ottenere un reale valore, abbiamo trattato il siero della paziente con PEG, ottenendo sul surnatante un valore normale di bilirubina totale (0.64 mg/dL). Come verifica della procedura, su 3 campioni della routine a diversi livelli di concentrazione, abbiamo ottenuto un recupero dopo precipitazione con PEG dal 97 al 104%. Questo caso mostra come è importante l'interfaccia tra clinica e laboratorio per evidenziare l'interferenza da paraproteine, e inoltre proponiamo una procedura che rilevi il valore corretto della bilirubina.

1. Smogorzewska A, Flood JG, Long WH, et al. Paraprotein interference in automated chemistry analyzers. Clin Chem 2004;50:1691-3.

P232

PROTEOMIC ANALYSIS OF SERUM SAMPLES FROM HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) TREATED PATIENTSV.M. Garrisi¹, M. Correale², A.M. Mastrosimini², I. Abbate¹, F. Fucilli³¹U.O.D. Patologia Clinica e Sperimentale, IRCCS Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari²U.O.C. Patologia Clinica, IRCCS "S. de Bellis", Castellana Grotte³U.O.C. di Radiologia, IRCCS "S. de Bellis", Castellana Grotte

HCC is the most common type of primitive liver cancer. Treatment options of HCC and prognosis are dependent on many factors but especially on tumor size and stage. In order to discover novel candidate biomarkers predictive of response to drug-eluting beads chemoembolization treatment, serum proteins differential expression was investigated in samples collected from 8 HCC treated patients at baseline and at disease control, using mass spectrometry.

Blood specimens from 8 treated patients with HCC, according to BCLC stage, were prospectively collected before starting drug-eluting beads chemoembolization, and after 45 days at the time of tumor assessment. In order to minimize pre-analytical variable effects all blood samples were managed in the same manner without any protocol amendment during the entire enrollment period. The collected blood was allowed to clot at room temperature for 1 h, centrifuged at 3500 rpm for 15 min and then stored in aliquots at -80°C.

All the proteinchip arrays were prepared according to manufacturer's guidelines. The 16 serum samples were analyzed by SELDI-ToF Mass Spectrometer (Bio-Rad Laboratories), and spectra generated in the mass to charge (m/z) range of 1500 to 35,000. All spectra were analyzed in order to discover novel candidate markers for predicting response to therapy comparing the samples collected before and after treatment. Peak detection and clustering, average peak intensities for the two groups were calculated. Expression Differences Mapping analysis was applied in order to generate a cluster peaks list which describes how a singular peak is expressed among all specimen spectrum. Subsequently P-values for each peak in the study group (before and after treatment) were calculated using the non-parametric Mann-Whitney U test. Also α -fetoprotein (Elecsys AFP II Roche Diagnostics) levels were measured before and after treatment.

Comparing the two groups, 47 differentially expressed peaks were highlighted. Among these, seven peaks had a statistical significance (p-value <0.05), in particular five peptides (at m/z 4789, 3259, 2674, 5342, 5545) resulted over-expressed in the serum specimens sampled before treatment while two peaks (at m/z 18241, and 32822) were down-expressed. Studies are now in progress in order to establish the identity and biological role of such peaks. World J Hepatol 2015;7:1020-9.

P233

POLIMORFISMI I/D DELL'ENZIMA DI CONVERSIONE DELL'ANGIOTENSINA (ACE) E DEL GENE eNOS:CORRELAZIONE CON IL GRADO DI IPERTENSIONE PORTALE IN PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA

C. Santonocito¹, D. Guarino¹, B.E. Annicchiarico², M. Scapaticci¹, M. Siciliano², C. Di Stasi³, M.E. Riccioni⁴, E. Capoluongo¹

¹Laboratory of Clinical Molecular Biology, Department of Biochemistry & Clinical Biochemistry, A. Gemelli Hospital-Catholic University, Rome, Italy

²Department of Internal Medicine, Teaching Hospital A. Gemelli Hospital-Catholic University, Rome, Italy

³Department of Bioimaging and Radiological Sciences, Institute of Radiology, A. Gemelli Hospital-Catholic University, Rome, Italy

⁴Digestive Endoscopy Unit, A. Gemelli Hospital-Catholic University, Rome, Italy

L'ipertensione portale è una sindrome clinica che si sviluppa nella maggior parte dei pazienti con cirrosi epatica in cui si assiste anche ad un'alterazione dell'equilibrio tra le molecole ad azione vasodilatatrice e quelle ad azione vasoconstrictrice. Tra queste di particolare importanza sono l'ACE ed eNOS i cui polimorfismi sono stati studiati in diverse patologie.

Oltre la metà della variabilità interindividuale nei livelli di ACE è conseguenza di un polimorfismo biallelico che prevede l'inserzione (I) o la delezione (D) a livello dell'introne 16 del gene di una sequenza alu di 287 bp. L'ossido nitrico (NO) è sintetizzato dall'ossido nitrico sintasi (NOS) e nella isoforma eNOS sono stati identificati due polimorfismi: lo SNP -786C>T che causa una riduzione dell'attività del promotore e lo SNP 894G>T che pare coinvolto nell'insorgenza dell'ipertensione arteriosa, nelle coronaropatie e nell'infarto del miocardio. Questo studio si propone di individuare l'esistenza di un'eventuale correlazione tra i polimorfismi -786T>C e 894G>T dell'eNOS e il polimorfismo I/D dell'ACE con la presenza e gravità dell'ipertensione portale in pazienti con cirrosi epatica e di valutare l'associazione tra il polimorfismo I /D dell'ACE e la presenza di varici gastro-esofagee, loro grado e precedente sanguinamento. Sono stati arruolati 51 pazienti affetti da cirrosi epatica e 51 controlli sani. I polimorfismi di eNOS -786T>C e 894G>T sono stati analizzati mediante high resolution melting analysis. I polimorfismi di ACE sono stati analizzati mediante PCR. I risultati mostrano che per lo SNP -786 T>C di eNOS non vi è alcuna correlazione statisticamente significativa con il grado di ipertensione portale che è invece dimostrata per lo SNP 894G>T. Nei controlli si evidenzia una correlazione significativa solo per lo SNP -786T>C ipotizzando una funzione protettiva per il genotipo CC. Inoltre i pazienti portatori dell'allele I ACE hanno un valore HVPG superiore, una maggiore prevalenza di varici gastro-esofagee e un maggior numero di episodi di sanguinamento. Pertanto nella cirrosi epatica il polimorfismo I/D di ACE e lo SNP 894G>T potrebbero giocare un ruolo nel determinare il rischio di sanguinamento di varici e la gravità dell'ipertensione portale.

Coto E, et al. J Cardiovasc Pharmacol 2001;38:833-9.

P234

NEW BIOMARKERS IN PATIENTS NAÏVE TO HCV ANTIVIRAL TREATMENT: A POSSIBLE PREDICTIVE ROLE?

F. Gulli¹, U. Basile¹, L. Colacicco¹, I. Miele², C. Napodano¹, N. De Matthaes², P. Cattani¹, G.L. Rapaccini²

¹Department of Laboratory Medicine, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

²Department of Internal Medicine, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

Background: Hepatitis C virus(HCV) may be responsible of extra-hepatic manifestations. The aim of this study is to identify early markers of autoimmune lymphoproliferative disease onset in a group of antiviral treatment-naïve patients infected by HCV that could identify the transition between a state of silent autoimmune and lymphoproliferative conditions and frank disease.

Methods: Fifty patients were recruited. Antinuclear antibodies(ANA) were detected by indirect immunofluorescence. Autoantibody detection of IgG directed against M2, gp210, SP100, LKM1, LC1, SLA, FcγR antigens were performed by Immunodot analysis. Free light chain (FLC) detection were carried out by turbidimetric assay. Cryoglobulin and cryofibrinogen analysis was carried out following the guidelines of the SIBIOC. Rheumatoid Factor IgG (RFIgG) was performed by ELISA. Collected data was computed using Statgraphics Plus 5.1 (STATPOINT TECHNOLOGIES, INC, Warrenton, Virginia, USA) e Graph-Pad (S. Diego, CA, USA).

Results: Our results show an 82% prevalence of cryoglobulinemia in samples collected from HCV-infected patients. Of these, 42% showed ANA positivity, a negligible percentage of autoantibody liver disease and absence of positivity of cryofibrinogen. The most significant result concerns the finding of high doses of FLC: 30% of positive patients show an abnormally elevated k/l ratio.

RFIgG showed an 42% prevalence. The linear discriminant analysis shows the possibility of formulating an algorithm based of our parameter (RFIgG, k/l ratio and K free) which can predict ANA response (+/-) in patients with positive cryoglobuline.

Conclusions: ANA positivity is indicative of the presence of a persistent antigenic stimulus by the virus and the activation of any autoimmune clones. The presence of cryoglobulinemia suggests a continuous lymphocyte stimulation. Interestingly, our results suggest a possible role of FLCs, RFIgG and Kfree values and their use to identify the transition between a silent state of probable autoimmune or lymphoproliferative disease or a frank illness. The presence of a subpopulation of HCVpositive patients may open new scenarios to targeted therapeutic treatment strategies in subclinical phases. Our study is a contribution to presenting a panel of potential predictive markers of disease progression

P235

PHARMACOGENOMICS INFLUENCE ON SEPSIS OUTCOME IN CRITICALLY ILL PATIENTS TREATED WITH LINEZOLID

G. Fatiguso¹, S. Allegra¹, L. Baietto¹, S. Corcione¹, N. Pagani¹, V.M. Ranieri², F.G. De Rosa¹, G. Di Perri¹, A. D'Avolio¹

¹Department of Medical Sciences, Unit of Infectious Diseases, University of Turin, Amedeo di Savoia Hospital, Turin

²Department of Surgical Sciences, University of Turin, City of Health and Science, Molinette Hospital, Turin

Sepsis is actually defined as a systemic inflammatory response syndrome with proven or probable infection of bacterial, fungal or viral source. It is a serious challenge in critically ill patients, indeed it is a common reason for admission to the intensive care unit (ICU); current increasing longevity could explain elevated sepsis incidence in developed countries. Sepsis may progress in severe sepsis and then, in worsen cases, evolve in septic shock and death. Linezolid is a Gram-positive antibiotic mainly eliminated in urine, currently used in clinical practice for sepsis. Pr#cha reported the important pharmacogenetics role in clinical outcome of sepsis patients(1); thus our aim was to investigate the correlation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in linezolid excretion and sepsis score. Ethical approval was given by the Ethical Committee of City of Science and Health-Molinette Hospital (ASPIRE Project 2010). 14 ICUs admitted patients in therapy with intravenous linezolid (600 mg q12h) were enrolled. We classified them in 3 groups: 0) sepsis, 1) severe sepsis and 2) septic shock. Genotyping for SNPs in MDR1 (C3435T, G2677T, C1236T), MRP2 (G-24A and G1249A), MRP4 (T*879C and T3348C), BCRP1 (C421A and T1194+928C), OAT1 (G-127A) and OCT1 (C 480G) genes was done using real-time PCR allelic discrimination assay. Mann Whitney statistical test was used to analyze variables. Concerning MDR1 G2677T genotypes, patients who had 0 of sepsis score were GG/GT and the 1 ones were TT (p=0.012). For MRP2 G1249A, GG genotype carriers had a score of 0 and GA ones had 1 (p=0.038); AA patients for this SNP were absent in our cohort. Regarding MRP4 variants, those with TT genotype for T*879C had 1 or 2 sepsis score (p=0.032); TT/TC patients for T3348C SNP had 0, whereas CC ones had 2 (p=0.040). Sepsis consists in a multiple organ dysfunction syndrome in which time is critical for the outcome. Our study, despite limited sample size, showed possible genetic markers useful for linezolid treatment; patient genetic profile could be decisive for sepsis early prediction and may improve the critically ill patients management.

1. Pr#cha M, Zazula R, Peková S. Genomic polymorphisms and sepsis-is there a reason for optimism? Prague Med Rep 2008;109:113-26.

P236

ANALISI DI TRE POLIMORFISMI NEL GENE DPYD IN UNA CASISTICA DI PAZIENTI CON TOSSICITÀ ACUTA DA TRATTAMENTO CON 5-FU

I. Mancini¹, L. Simi¹, A. Lunghi², L. Antonuzzo², M. Mangoni³, F. Malentacchi¹, F. Salvianti¹, S. Gelmini¹, S. Nobili⁴, E. Mini⁴, A. Ribecco⁵, M. Pazzagli¹, P. Pinzani¹

¹SOD Biochimica Clinica e Molecolare, AOUC Careggi e Biochimica Clinica, Università di Firenze

²Oncologia Medica I, AOU-Careggi, Firenze, Italy

³Radioterapia, AOU-Careggi, Firenze, Italy

⁴Dip. Farmacologia, Università di Firenze, Italy

⁵Oncologia Medica, San Giovanni di Dio, Florence, Italy

Introduzione: L'attività della deidropirimidina deidrogenasi (DPD) è soggetta ad un'alta variabilità funzionale dovuta a un ampio numero di polimorfismi. Alcuni di questi polimorfismi possono essere responsabili di eventi di tossicità in risposta al trattamento con 5 fluorouracile (5-FU). Tale variabilità genetica si traduce in una ampia variabilità a livello dell'attività enzimatica da parziale (3-5% della popolazione) alla sua perdita completa (0.2%) dell'attività enzimatica. Tra le numerose varianti descritte la IVS14+1G>A è sicuramente la più importante ed è responsabile dei maggiori effetti avversi in risposta al trattamento, di conseguenza la sua ricerca in fase pretrattamento è fortemente raccomandata.

Metodi: In questo studio si riporta la nostra esperienza nell'utilizzo di un approccio basato su High Resolution Melting e sequenziamento per la ricerca di tre polimorfismi di DPYD: IVS14+1G>A (rs67376798); c.1679T>G (rs55886092) e c.2846A>T (rs67376798) in 601 campioni di DNA estratto da pazienti in attesa di effettuare il trattamento.

Risultati: L'analisi ha rivelato la presenza di varianti nell'esone 14 del gene DPYD in 35 campioni, fra questi la variante intronica è stata individuata in 6 campioni mentre per gli altri campioni sono state descritte varianti con effetto fenotipico meno importante. Sfortunatamente, tra i 573 pazienti risultati wild type per l'esone 14, al momento 80 (dati clinici in fase di raccolta) hanno evidenziato tossicità dopo il primo ciclo di terapia. Al fine di identificare la causa di tale effetto una maggiore caratterizzazione genetica è stata condotta su questi pazienti, includendo il test per c.1679T>G (rs55886092) e c.2846A>T (rs67376798)

Conclusioni: Dato il considerevole numero di pazienti trattati ogni anno con 5-FU, e il costo umano ed economico degli effetti tossici collaterali di grado 3 e 4, la caratterizzazione genetica di almeno 3 marcatori deve essere considerata obbligatoria. Inoltre, per massimizzare il ruolo informativo del test genetico di DPYD ulteriori approfondimenti si rendono indispensabili per definire il pannello di polimorfismi più informativo ai fini di una più completa prevenzione della tossicità indotta dai farmaci chemioterapici.

P237

ONE-CARBON METABOLISM DISTURBANCES IN TREATED PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASEM.C. Gueli*Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNEC), Università degli Studi di Palermo*

L-DOPA alone or in combination with a peripheral dopa decarboxylase inhibitor (DDI) is the most effective therapeutic agent to improve motor function in most patients with Parkinson's disease (PPD). However, chronic L-DOPA therapy is associated with side-effects arising particularly during long-term therapy. Only a small percentage of an exogenous dose of L-DOPA is converted into dopamine (DA) in the brain.

The majority is either decarboxylated in peripheral tissues by aromatic amino acid decarboxylase (AAD) to DA, which does not cross the blood-brain barrier, or is O-methylated by catechol-O-methyltransferase (COMT) in both peripheral and brain tissue to yield 3-O-methyldopa (3-OMD). To raise brain DA levels, a large amount of L-DOPA must be administered. It has been reported that such large doses of L-DOPA can affect sulphur amino acid metabolite levels. Therefore, O-methylation of L-DOPA to 3-OMD is linked with the conversion of SAM to S-adenosylhomocysteine (SAH) that is subsequently split into adenosine and Hcy.

To evaluate the impact of long-term application of L-DOPA/DDI formulations on plasma methionine (MET), SAM, SAH and tHcy levels in PPD.

Patients were from the Section of Neurology R.N., Palermo University. There were 10 PPD treated with L-DOPA/DDI formulation and 10 healthy controls. Peripheral blood samples were taken in the morning after the subjects had fasted and were off medication for at least 12 hrs. Plasma tHcy and sulphur metabolite levels were determined by HPLC as reported.

The levels of MET and SAM in the treated PPD were significantly lower (ca 1.21 and 1.32 fold, respectively) than in the controls while the levels of tHcy (mean 16.6 $\mu\text{mol/L}$; SD 4.4) were higher compared with controls (mean 9.8 $\mu\text{mol/L}$; SD 3.4). No significant differences in SAH levels appeared. We hypothesized that another consequence of high-dose e/or long-term L-DOPA administration might be hyperhomocysteinaemia and may also represent a risk factor for both ischaemic heart and cerebrovascular disease in treated PPD. Besides, the resulting hyperhomocysteinaemia might be increased if L-DOPA therapy is superimposed on a condition known to impair Hcy metabolism, such an enzyme defect or B/acid folic vitamin deficiency.

Wise Cκ et al. (1995) J Liq Chromatogr 18, 2005.

P238

DETERMINAZIONE IN HPLC DELLA VITAMINA D₃ IN UNA POPOLAZIONE AFFERENTE ALLA MEDICINA DI LABORATORIO DELL'AZIENDA OSPEDALIERA SAN GIOVANNI ADDOLORATA DI ROMAS. Melloni, F. Bottan, T. Tolli, M. Gaudio*U.O.C. Patologia Clinica, A. O. San Giovanni Addolorata, Roma*

Scopo dello studio: La carenza di vitamina D è frequente in Italia soprattutto nei soggetti anziani, è responsabile di patologie ossee e risulta anche associata ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari, stati infiammatori e cancro. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare lo stato della vitamina D₃ in una popolazione afferente alla Medicina di Laboratorio dell'A.O. San Giovanni Addolorata di Roma.

Materiali e metodi: Lo studio è stato condotto su 1531 pazienti nel periodo compreso tra gennaio e luglio 2014. La determinazione di 25(OH)D₃ è stata effettuata su siero mediante l'analisi in HPLC.

Risultati: Gli studi hanno evidenziato un'insufficienza di vitamina D nei pazienti appartenenti a diverse fasce di età (20-49 anni: 25 ng/mL; 50-64 anni: 28 ng/mL e >65 anni: 27 ng/mL). Livelli bassi di 25(OH)D₃ si sono riscontrati anche in soggetti di più giovane età con carenze molto gravi nel 9% dei casi.

Discussione e conclusioni: Questo è uno studio preliminare a cui faranno seguito ulteriori indagini per consentire di individuare possibili soluzioni nel trattamento di pazienti affetti da patologie croniche riconducibili ad ipovitaminosi D.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Endocrine Society Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:1911-30.

P239

P1NP AND CTx IN OSTEOPOROSIS THERAPY MONITORING: A REAL LIFE EXPERIENCE

M. Biffi¹, C. Calvi², G. Resmini¹

¹U.O. Medicina di Laboratorio, A.O. Treviglio Caravaggio

²Roche Diagnostics spa

³U.O. Ortopedia e traumatologia, A.O. Treviglio Caravaggio

Osteoporosis is characterized by low bone mass and structural deterioration of bone tissue, resulting in increased fragility and susceptibility to fracture. Currently bone mineral density is the WHO standard for diagnosis of osteoporosis, but poor sensitivity means that potential fractures will be missed if it is used alone. During the past decade, progress has been made in the identification and characterization of biomarkers to aid the management of metabolic bone disease. The International Osteoporosis Foundation (IOF) and the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) have evaluated the clinical potential of bone turnover markers (BTMs) in the prediction of fracture risk and for monitoring treatment. One bone formation marker (serum procollagen type I N propeptide, s-P1NP) and one bone resorption marker (serum C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, s-CTX) have to be used as reference markers, measured by standardized assays in observational and intervention studies.

The aim of this study: assess the capability of BTMs (P1NP - CTx) to monitor patient under Biphosphonate therapy, evaluating the response and adherence.

57 patients from Treviglio Hospital were diagnosed of Severe Osteoporosis and followed since 2013 with Biphosphonate Therapy during last 2 years. They were monitored through P1NP and CTx measurement every year and with BMD every 2 years. Following IOF/IFCC recommendations, Elecsys® P1NP and Elecsys® CTx (ECLIA, Roche Diagnostics) were used as monitoring tests. Sample collection was standardized in EDTA plasma and performed in the morning, in a fasting state.

50 patients showed a decrease of both biomarkers, P1NP of about 57% (15%-88%), and CTx of about 56% (15%-87%), 5 patients showed an increasing in biomarkers levels: 4 had an increase of PTH levels, lacking Vitamin D that was supplemented, interrupting therapy. In one patient, P1NP increased about 86% after a therapy replacement with Teriparatide.

On the bases of our experience, the least significant change of P1NP is about 15% so all changes over this value must be taken under consideration as clinically useful.

The use of P1NP and CTx biomarkers seems to be useful in monitoring and addressing therapy in severe osteoporosis patients, verifying the therapy adherence too.

1. Vasikaran S, et al. Osteoporos Int 2011;22:391–420.

P240

REFERENCE INTERVALS FOR BONE TURNOVER MARKERS: A NEED FOR HARMONIZATION

F. Pagani¹, C. Callà², R. Dittadi³, S. Gelsumini⁴, A. Vernocchi⁵, C. Cosma⁷, M. Zaninotto⁷

¹Dip. Medicina di Laboratorio, Fondazione Poliambulanza Istituto Ospedaliero, Brescia

²Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico A. Gemelli, Roma

³Lab. Biochimica Clinica, Osp. dell'Angelo, Venezia

⁴Lab. Analisi, Osp. di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

⁵Servizio di Medicina di Laboratorio, IRCCS Multimedica, Milano

⁶Gruppo di Studio SIBioC Biochimica Clinica e Metabolismo Osseo

⁷UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

Bone Turnover Markers (BTMs) are classified as either bone formation markers, secreted by osteoblasts during bone formation, or bone resorption markers, degradation products of bone collagen or enzymes secreted by osteoclasts. Their concentrations in blood or urine are considered to reflect bone formation and resorption rates. A lot of data in the literature support their clinical usefulness in the prediction of fracture risk and in monitoring the treatment of osteoporosis. A proposed goal of anti-resorptive therapy is to reduce BTMs to the lower half of the reference range for healthy young premenopausal women. Bone formation markers available for routine use include osteoblast-derived products such as Procollagen I Intact N-Terminal (PINP), Bone-specific Alkaline Phosphatase (BALP) and Osteocalcin (OC). All bone formation markers are measured in blood. Bone resorption markers include product from osteoclast activity, the collagen breakdown products Amino-terminal Telopeptides of type I collagen (NTX), the Carboxy-Terminal Telopeptide of type I collagen (CTX), and the Deoxypyridinoline (DPD). NTX and DPD are measured in urine while CTX is measured in blood. There are method-specific differences between commercial assays for each BTM due to assay specificity, fragment recognition as well as differences in standardisation. Until harmonisation of methods for each biomarker is achieved, results and reference intervals from different methods cannot be used interchangeably for clinical care or in research studies, and patients should be monitored by the use of the same method over time. A search of literature on PubMed and data from diagnostic company sheets was conducted in order to review proposed reference intervals for BTMs. In particular, we analyzed and reported data for more common BTMs used, such as BALP, OC, PINP and NTX, CTX, DPD. Recently, IOF/IFCC working group recommends one bone formation marker, s-PINP, and one bone resorption marker, s-CTX, to be used as reference markers and measured by standardised assays in observational and intervention studies. More data regarding standardized/harmonized reference intervals are needed, in particular, the age and gender-dependent reference range.

P241

FREE LIGHT CHAINS (FLC) E DANNO RENALE: CASI CLINICI A CONFRONTO

L. Demarinis¹, T. Troiano¹, R. Ria², M.G. D'Alise¹, A. Fiore¹, F. Di Serio¹

¹*U.O.C. Patologia Clinica Ospedaliera, Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico - Bari*

²*Dipartimento di Scienze Biomediche Medicina Interna C. Baccelli Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico - Bari*

Background: Il mieloma multiplo a catene leggere (LCMM) è una discrasia plasmacellulare caratterizzata da un'espansione neoplastica di linfociti di tipo B che producono catene leggere libere monoclonali di tipo kappa o lambda.

In passato, per la diagnosi e il monitoraggio si utilizzavano i seguenti test di laboratorio: immunofissazione sierica (sIFE), immunofissazione urinaria (u-IFE) e dosaggio della PBJ sulle urine delle 24h. Oggi il percorso diagnostico di queste patologie è stato rivoluzionato dal dosaggio delle sFLC.

Metodi: Due soggetti maschi (75aa,57aa) affetti da LCMM con concentrazioni elevate di sFLC sono stati monitorati nel periodo settembre 2013 - marzo 2015 con: elettroforesi sierica (CZE), Immunofissazione sierica (s-IFE), u-IFE, dosaggio delle PBJ (Sebia) e sFLC (Binding Site).

Risultati: Il soggetto di 75aa, presentava alla CZE lievi alterazioni in zona gamma, la s-IFE, la u-IFE e la ratio k/λ evidenziavano catene leggere libere monoclonali tipo kappa.

Il soggetto di 57 aa non presentava alcuna alterazione morfologica alla CZE, la s-IFE era negativa mentre la u-IFE e la ratio k/λ evidenziavano catene leggere libere monoclonali tipo kappa.

Gli esami ematochimici all'esordio della malattia nel soggetto di 57aa e nel soggetto di 75aa erano rispettivamente i seguenti: GFR 39 e 87 mL/min, sFLC=7323 e 4660=mg/L, BPJ= 4077mg/24h e 3851mg/24h.

Il soggetto di 57aa è stato sottoposto a biopsia renale che evidenziava una nefropatia tubulo-interstiziale cronica.

Conclusioni: Il confronto tra i due soggetti con LCMM conferma quanto riportato in letteratura ossia che le sFLC sono responsabili del danno renale a causa delle nefrotossicità dovuta alle loro proprietà intrinseche. L'elevata concentrazione per sé può non causare danno renale

La possibilità di individuare in fase precoce di malattia la nefrotossicità da sFLC rappresenta un vantaggio sia per il clinico che per il paziente, poiché la chemioterapia combinata con il trattamento dialitico migliora la funzionalità renale.

Mussap M, Merlini G. Pathogenesis of renal failure in multiple myeloma: any role of contrast media? Review Article. Biomed Res Int 2014;2014:167125.

P242

URINE CONDUCTIVITY FOR THE EVALUATION OF KIDNEY TUBULAR FUNCTION

M. Greco, M. Renis, F. Sicuro, M. Bonerba, G. Lobreglio

U.O. Patologia Clinica, P. O. "Vito Fazzi", ASL Lecce

Background and aim: Urine conductivity is a simple, cheap and not time consuming method which appears a useful parameters in urinalysis since it can be easily correlated to electrolyte concentration.

The aim of the present study was to determine the feasibility of urine conductivity measurement as evaluation of renal function, in particular for the study of tubular reuptake of different ion species.

Materials and Methods: We measured electrolyte (sodium, potassium, chloride, calcium and phosphorous g/L), creatinine in serum and urine by Roche Modular P analyzer; eGFR (mL/min/1,73 square meter) was calculated with CKD-EPI equation; urine conductivity (mS/cm) were measured by Sysmex UF-1000. Both serum and urine were obtained from 205 patients afferent to the Laboratory of Clinical Pathology of Lecce "Vito Fazzi" Hospital whose primary diseases were not taken into consideration.

Results: Ions reuptake was calculated by daily ions filtration minus total ions urine excretion in 24H divided by total ions filtration, for each ion species and for total ions. Average value for total ions reuptake was 0.979 (range 0.925-0.999), urine conductivity was 14.6 mS/cm (range 4.2-29.3). As expected, a trend of positive correlation was observed for each different ion urine excretion (g/24H) and conductivity, with a bigger influence of chloride and sodium. A trend of inverse correlation was observed for total ions reuptake and conductivity, although not statistically significant when all patients were included. When patients were divided in two groups of normal or abnormal eGFR (≥ 90 or <90 mL/min, respectively) or on the basis of reuptake of ions species (normal reuptake ≥ 0.99 , abnormal <0.99), statistically significant results were obtained: conductivity was significantly increased in the group of patients with abnormal ions reuptake (both for total ions species with $p<0.05$ and for single sodium or chloride, with <0.05 , <0.01 respectively), while no statistically significant difference in conductivity values was observed in the two groups of patients divided with normal/abnormal eGFR values.

Conclusions: This study results suggest that urine conductivity determination could be a useful parameter for abnormal renal function evaluation and reduced renal tubular reuptake.

P243

DISTRIBUZIONE DEI VALORI DI CREATININA ENZIMATICA NELLA POPOLAZIONE LIVORNESE

M. Demi¹, S. Manzini¹, C. Martinelli¹, M. Fiorini¹, P. Brunori², M. Tronchin³, I. Simonetti³

¹Laboratorio Patologia Clinica, ASL 6 Livorno

²Laboratorio Patologia Clinica, ASL 6 Piombino

³Abbott Diagnostics, Roma

In seguito alla ristandardizzazione della Creatinina Enzimatica (Abbott) in uso presso il nostro laboratorio è stata valutata la distribuzione di questo analita nella popolazione afferente. Sono stati processati 6533 risultati di pazienti apparentemente sani, divisi per sesso e provenienza geografica (Livorno, Cecina, Piombino e Portoferraio) con un comune foglio elettronico (MS Excel) potenziato dal plug-in Analyse-it. Sono stati così determinati i percentili 2,5* e 97,5* con i rispettivi intervalli di confidenza al 90% per la popolazione generale e per tutte le classi sopra menzionate. Per le classi maschi (3436 soggetti) e femmine (3097 soggetti) è stata effettuata l'analisi della distribuzione secondo Hoffmann (1). Sono stati ottenuti i seguenti intervalli: femmine 0,52-1,26 (claim 0,55-1,02) mg/dL e maschi 0,68-1,75 (claim 0,73-1,18) mg/dL. L'analisi secondo Hoffmann stima per le femmine un intervallo compreso tra 0,51 e 0,78 mg/dL e per i maschi un intervallo compreso fra 0,66 e 1,05 mg/dL. Cecina e Piombino presentano valori mediani superiori a Livorno, mentre quelli di Portoferraio sono simili. La maggior concentrazione di creatinina nei maschi viene confermata, le differenze fra zone, pur essendo statisticamente significative, risultano clinicamente irrilevanti (< 0,05 mg/dL nelle mediane). L'analisi della distribuzione della popolazione afferente e la valutazione secondo Hoffmann producono risultati contrastanti, essendo entrambe stime della popolazione di riferimento questo dato sarà oggetto di ulteriori approfondimenti e discussioni. (1)

Hoffmann RG. Statistics in the Practice of Medicine. JAMA 1963;185:864-73.

P244

TEST DI FARLEY: CONFRONTO TRA MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE E ANALISI AD IMMAGINE CON ANALIZZATORE AUTOMATICO PER LA VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA ERITROCITARIA URINARIA

G. Covili Faggioli¹, T. D'Atena¹, E. Di Somma¹, M.A. Laudadio¹, T.P. Papillo¹, L.P. Dicembre², N. Gargioli², A. Gatti², L. La Fortezza², M. Maglione², F. Pazzini², E. Sergio², S. Suppressa², A. Pasini³, E. Monti³, O. Baraldi⁴, R. Mancini⁵

¹Azienda Ospedaliera S. Orsola - Malpighi, Laboratorio Unico Metropolitan, Bologna

²Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica, Università degli Studi di Bologna

³U. O. Nefro-dialisi pediatrica, Azienda Ospedaliera S. Orsola - Malpighi, Bologna

⁴U. O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Azienda Ospedaliera S. Orsola - Malpighi, Bologna

⁵Direttore f. f. Laboratorio Unico Metropolitan, Bologna

Scopo del lavoro: Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare la validità e la sovrapposibilità di due metodi diversi: la microscopia a contrasto di fase e l'analisi ad immagine con analizzatore automatico Sedimax (A.Menarini Diagnostics) per la valutazione della morfologia eritrocitaria urinaria nella diagnosi differenziale delle microematurie.

Materiali e metodi: E' stata eseguita da due dirigenti la conta di 100 emazie su 33 campioni di urine di 27 pazienti afferenti soprattutto dalla Nefrodialisi Pediatrica, valutati con entrambi i metodi: analisi ad immagine, tramite raccolta di 15 immagini (o 30 in caso di basso numero di emazie) e microscopia a contrasto di fase, utilizzando l'obiettivo 40X, previa centrifugazione del campione di urina a 2000 rpm 10', eliminando l'urina eccedente e risospesando il sedimento in 0.5 ml. Il risultato è stato espresso come percentuale di emazie isomorfiche, dismorfiche e acantociti orientando verso l'eziologia urologica o nefrologica della microematuria. Seguendo i criteri di Fogazzi, sono stati esclusi i campioni con PS <1008, pH >8.0, emazie <3 per campo, presenza di macroematuria.

Risultati: In 26 campioni i risultati ottenuti con i due metodi sono sovrapposibili: 10 Microematurie Isomorfiche di Probabile Origine Urologica, 6 Microematurie Dismorfiche di Origine Glomerulare e 10 Microematurie Miste. Nei restanti 7 campioni la diagnosi è risultata differente.

Conclusioni: I risultati ottenuti sono preliminari e necessitano di ulteriori approfondimenti. I dati tra i due sistemi sono sovrapposibili e la refertazione con analisi ad immagine potrebbe essere utilizzata come ausilio alla microscopia a contrasto di fase, particolarmente nei casi più complessi dove necessiti una second opinion.

1. Fogazzi GB, Edefonti A, Garigali G, et al. *Pediatr Nephrol* 2008;23:1093-100.

2. Bonsib SM. *Am J Pathol* 1985;119:357-60.

3. Praga M, Gonzales E. *Kidney Int* 2010;77:956-61.

4. Sigala JF, Biava CG, Hulter HN. *Arch Intern Me* 1978;138:1419-21.

P245

NGAL COME BIOMARKER DI DANNO RENALE ACUTO NEL REPARTO DI CURE INTENSIVE POST-OPERATORIE

G. Introcaso¹, C. Beverini², S. Gregu², A. Bonomi¹, C. Calvara¹, C. Frassi¹, V. Guerra¹, C. Miggiano¹, G. Piras¹, L. Rondelli¹, S. Sabella¹, T. D'Errico¹, D. Riggio¹, E. Sisillo², M.T. Sandri¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Centro Cardiologico "Monzino"

²U.O di Anestesia e Rianimazione, Centro Cardiologico "Monzino"

Introduzione: La complicità renale acuta postoperatoria non può essere rilevata precocemente tramite la creatininemia o GFR poiché la sensibilità di tali test è ridotta, sono quindi inefficaci per intervenire terapeutamente in tempo utile. L'NGAL è un nuovo biomarker di danno renale a oggi promettente; non esistono, tuttavia, protocolli clinici applicativi. Scopo del presente studio è stato valutare l'NGAL in terapia intensiva per la diagnosi di AKI (acute kidney injury) dopo intervento cardiocirchirurgico con procedura di circolazione extracorporea.

Materiali e Metodi: Abbiamo selezionato, ad oggi, 45 pazienti con almeno due dei seguenti criteri di inclusione: età > 70 anni, GFR < 60 ml/min (stimata con formula MDRD), FE < 41%, Redo operation, intervento combinato. Insieme ai dati clinici sono stati raccolti i dati di creatininemia: basale, in prima, seconda giornata e alla dimissione, che insieme alla diuresi sono stati utilizzati nella definizione clinica di AKI di grado 2 o 3. In sala operatoria, prima dell'intervento cardiocirchirurgico e all'arrivo in terapia intensiva, sono stati effettuati due prelievi per l'esecuzione dell'NGAL. I campioni di plasma EDTA sono stati stoccati a - 80° C, quindi analizzati in unico batch con sistema TRIAGE (Alere). E' stata effettuata un'analisi statistica dei risultati tramite regressione logistica.

Risultati: Dai dati clinici sono stati trovati 8 pazienti con AKI in terapia intensiva (18% dei pazienti esaminati) i cui valori di NGAL sono risultati compresi tra 136 e 608 ng/mL, lasciando intuire che la definizione di un cut-off decisionale non risulta facilmente calcolabile. I valori mediani dei casi di NGAL pre-post operatorio sono stati rispettivamente: AKI 139-226 ng/mL, non AKI 79-150 ng/mL. E' stato stimato per i casi AKI il delta di concentrazione di NGAL (post/preoperatorio) con valore mediano del rapporto= 2,6. L'analisi statistica multivariata ha evidenziato una significativa associazione tra gli incrementi di NGAL e la diagnosi di AKI di grado 2 o 3 (p= 0,0021, r= 0,47).

Conclusioni: Il biomarker NGAL ha mostrato risultati preliminari interessanti rispetto alla possibile applicazione e utilità clinica. Rimane da indagare la definizione di un cut-off decisionale per AKI includendo un maggior numero di pazienti.

P246

UTILIZZO DELLA COMPONENTE RESOLVED DIAGNOSIS PER LA PREDITTIVITÀ DEL RISCHIO CLINICO IN OPERATORI SANITARI IPERSUSCETTIBILI ESPOSTI AL LATTICE

I. Cuomo¹, C. Ritonnaro², S.I.C. Sagliano¹, S. Costanzo¹, M. Lamberti², E. Di Fiore², G. Panariello², N. Medici¹, S. Abbadessa¹

¹Dip. di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale, Sez. di Immunopatologia. Seconda Università degli studi di Napoli

²Dip. di Medicina Sperimentale, Sez. di Igiene, Medicina del Lavoro e Medicina Legale. Seconda Università degli studi di Napoli

Introduzione: Tra le malattie professionali, l'allergia al lattice merita particolare attenzione a causa dei rischi associati alla sensibilizzazione nell'ambiente di lavoro.

Scopo dello studio: L'allergologia molecolare supporta il medico competente (MC) nella gestione di lavoratori ipersuscettibili in quanto, fornendo uno specifico profilo di sensibilizzazione, stratifica il rischio allergologico.

A tale scopo, con il dipartimento di medicina del lavoro, abbiamo rivalutato gli operatori sanitari (OS) dell'ASL Salerno aventi un giudizio d'idoneità alla mansione con prescrizione di utilizzo di guanti latex free, con la diagnostica allergologica molecolare.

Materiali e metodi: Di 54 OS di età compresa tra 18-65 anni sono state dosate le IgE totali (tIgE), IgE specifiche (sIgE) per il lattice (k82) e le sue molecole (rHev b1, rHev b3, rHev b5, rHev b 6.01, rHev b 6.02, rHev b8, rHev b9, rHev b11) con metodo FEIA (Thermo Fisher) utilizzando un analizzatore UniCap250.

Risultati: I soggetti analizzati presentano tIgE comprese tra (4,54-2516 kU/l). 45 OS (83,3%) hanno valori di sIgE negativi per K82 (<0,10 kU/l), 9 OS (6,7%) hanno valori di sIgE positivi per K82, di cui 5 con positività medio-bassa (0,20-1,61 kU/l) e 4 alta-molto alta (4,44-24,4 kU/l). Gli OS positivi a K82 possono essere raggruppati per la positività alle componenti molecolari: 2 OS (3,7%) positivi a rHev b8, 4 OS (7,4%) positivi a rHev b 5, rHev 6.01, rHev 6.02 e 3 OS (5,6%) positivi sia a rHev b8, che a rHev b 5, rHev 6.01, rHev 6.02.

Conclusioni: Il contributo diagnostico della CRD supporta il MC per esprimere un giudizio d'idoneità basato sulla valutazione del rischio di eventi clinici sistemici. Agli OS sensibilizzati a rHev b5 e rHev b6, ritenuti responsabili di reazioni anafilattiche, verrà effettuata adeguata formazione ed informazione, nonché valutata una limitazione temporanea; gli OS monosensibilizzati alla profilina rHev b8, che presentano un basso rischio di reazioni allergiche, saranno invece sottoposti a misure meno restrittive. Pertanto questo tipo di valutazione gioca un ruolo di primaria importanza nella gestione del lavoratore ipersuscettibile.

1. Bilo MB, Antonicelli L, Braschi MC, et al. CRD nell'allergia al lattice. Ligand Assay 2010;15:39-48.

P247

ASSESSMENT OF FREE LIGHT CHAINS SERUM CONCENTRATIONS IN SEVERE ASTHMA PATIENTS: A PRELIMINARY STUDY

G. Santini¹, E. Torti², M.T. Dell Abate², N. Mores¹, C. Napodano³, F. Gulli⁴, G.L. Rapaccini⁴, U. Basile³, P. Montuschi¹

¹Lab. di Farmacologia, Policlinico "A. Gemelli", Roma

²Lab. di Biochimica Clinica, Analisi 1, Policlinico "A. Gemelli", Roma

³Dip. di Medicina di Laboratorio, Policlinico "A. Gemelli", Roma

⁴Dip. di Medicina Interna, Policlinico "A. Gemelli", Roma

Background: Increased polyclonal free light chain (FLC) concentrations have been described in a variety of inflammatory diseases. Moreover, FLCs have been implicated in a series of functions, including mast cell activation thus playing a central role in inflammatory processes. Elevated serum FLC concentrations have been reported in asthma, a condition implying chronic airway inflammation leading to bronchoconstriction and respiratory symptoms. IgE-independent mast cell activation as well as reduction of hypersensitivity upon suppression of FLC-dependent mast-cell activation has been reported.

The aim of our study was to assess FLC serum concentration in severe asthmatic patients in order to evaluate their role in the pathophysiology of asthma.

Materials and Methods: We analyzed serum samples from 23 severe asthmatic patients (15 #, 8 #, aged 25-75 yrs), and 24 healthy age-matched and sex matched controls, collected at baseline (BL) visit. In severe asthmatic patients, another serum sample was collected after 12-18 months longitudinal (LT) visit. FLC values (λ and κ) and IgE serum levels were assessed. Diagnosis and severity of asthma was based on GINA guidelines.

Results: Compared with healthy control subjects, serum λ FLC concentrations were increased in severe asthma patients at both BL ($P=0.0096$) and LT visit ($P=0.0024$). No differences were observed for either κ or FLC ratio values between severe asthma patients and healthy subjects. In severe asthma patients, serum FLC levels at BL and LT visit were similar as well as following stratification of the asthma cohort according to IgE levels (IgE<100 UI/mL, n=7; IgE>100 UI/mL, n=23).

Discussion and conclusions: We report elevated serum FLC λ values in severe asthmatic patients which seems to be stable over time (asthma BL λ values vs LT λ values). Further studies are required to assess the clinical utility of serum FLC measurement and as the potential therapeutic implications of the suppression of their serum levels. FLCs stability might represent a valuable tool for monitoring asthma patients.

Kraneveld AD, Kool M, van Houwelingen AH, et al. Elicitation of allergic asthma by immunoglobulin free light chains. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:1578-83.

P248

DOSAGGIO AUTOMATIZZATO DELL'ORMONE ANTI-MULLERIANO (AMH): CONFRONTO TRA METODI E SUO UTILIZZO

M. Brugia, F. Balducci, M. Piaggese, A. Calcinari

Lab. di Biochimica Clinica e Microbiologia, azienda Ospedali Riuniti Ancona

Premesse e scopo dello studio: L'ormone anti-mulleriano (AMH) è prodotto dalle cellule della parete dei follicoli primari e pre-antrali che costituiscono la riserva ovarica. La sua produzione è indipendente dalla stimolazione ovarica da parte di altri fattori per cui il suo livello permane relativamente costante. Alcuni studi hanno evidenziato come bassi livelli di AMH siano associati ad una scarsa risposta alla stimolazione ovarica in cicli di fecondazione in vitro e a bassi tassi di successo (1). Recentemente molti lavori scientifici mostrano l'utilità del dosaggio di AMH anche in altri ambiti clinici. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le performance analitiche di un test automatizzato (ECLIA) nei confronti di un test manuale (EIA) e l'utilità clinica del dosaggio stesso.

Materiali e metodi: Sono stati studiati 80 campioni di siero relativi a 80 pazienti (età media 36.7 anni) afferenti al nostro centro prelievi o provenienti da altri ospedali della Regione Marche dal 01/01/15- 01/03/15. Delle donne studiate, 5 erano in trattamento chemioterapico, le restanti 75 presentavano problematiche di infertilità. Tutti i campioni sono stati dosati con metodo manuale immunoenzimatico (AMH Ila gen Beckman Coulter) e confrontati con il metodo chemiluminescente automatizzato su strumentazione Cobas 6000 (AMH Roche).

Risultati e conclusioni: Sul totale di 80 pazienti studiate si è ottenuto un valore medio di 1.60 \pm 2,59 ng/ml per il metodo manuale e di 1.46 \pm 2,72 ng/ml per il metodo automatizzato. La retta di correlazione ottenuta tra i valori mostra un $R^2 = 0.978$. 39 pazienti (48.7% ; età 38.9 \pm 4,2 anni) avevano valori di AMH <0.5 ng/ml; 21 pazienti (26.3%; età 35,7 \pm 4,7 anni) avevano valori di AMH tra 0.6 e 1.5 ng/ml; 20 pazienti (25%; età 33 \pm 8,2 anni) avevano valori di AMH maggiori di 1,5 ng/ml.

Solo 5 pazienti erano in trattamento chemioterapico (età 17,2 \pm 0,01 anni), dosaggio eseguito per monitorare l'eventuale impoverimento follicolare causato dai farmaci.

Bibliografia

1. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, et al. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? Bjog 2005;112:1384-90.

P249

ANALISI RETROSPETTIVA DEI VALORI DI ENOLASI NEURONE SPECIFICA IN PAZIENTI PEDIATRICI RISPETTO AI PAZIENTI ADULTIA. Pocognoli¹, F. Balducci¹, M. Piaggese¹, M. Brugia¹, P. Pierani²¹Laboratorio di Biochimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedali Riuniti, Ancona²Oncematologia Pediatrica, Azienda Ospedali Riuniti, Ancona

Introduzione: L'enolasi neurone specifica (NSE) è un enzima glicolitico prodotto dal sistema nervoso centrale e periferico e dal tessuto neuroendocrino. Ha un'alta sensibilità e specificità per i neuroblastomi pertanto trova impiego sia per la diagnosi che per il monitoraggio di tale tumore che colpisce prevalentemente i bambini fino ai 10 anni di età. Ad oggi non esistono intervalli di riferimento diversificati tra pazienti adulti e pediatrici. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare retrospettivamente, nella nostra popolazione, la distribuzione dei valori di NSE con particolare riguardo alla fascia di età dalla nascita ai 15 anni e confrontarla con i valori di riferimento attuali.

Materiali e metodi: Tra l'1/01/2009 e il 30/03/2015 sono stati esaminati 14.635 campioni di siero afferenti al laboratorio dai reparti interni e dagli Ospedali della regione Marche. Il dosaggio dell'NSE è stato effettuato mediante metodo ECLIA, Cobas 6000 Roche (sensibilità <0,05 ng/mL). L'intervallo di riferimento attualmente in uso nel nostro laboratorio è 0-16,5 ng/ml. La popolazione è stata suddivisa in 4 gruppi: pazienti tra 0-15 anni e pazienti tra 16 e 100 anni suddivisi entrambi in oncologici e non oncologici. È stato esaminato anche un gruppo di 80 campioni di pazienti pediatrici senza neuroblastoma.

Risultati: Dei 656 campioni di pazienti pediatrici analizzati retrospettivamente 95 mostrano valori di NSE (305±85,8 ng/ml) significativamente più alti rispetto a quelli di pazienti non oncologici (29,5±6,31 ng/ml). Lo stesso trend si verifica confrontando i valori di NSE nei campioni di pazienti adulti oncologici (34,1±13,2 ng/ml) e non oncologici (16,4±1 ng/ml). I valori medi dei campioni della popolazione pediatrica non oncologica suddivisi per fasce di età mostrano valori medi di NSE compreso tra 39,5 ng/ml e 17,0 ng/ml. Valori medi più elevati si riscontrano anche nella popolazione presa come gruppo di controllo. Conclusioni: I valori medi di NSE sono molto più alti nella fascia di età compresa tra 0 e 15 anni rispetto alla popolazione adulta. Sarebbe quindi opportuno adottare un intervallo di riferimento adeguato per i pazienti pediatrici per migliorare la diagnosi, il follow-up dei pazienti ed evitare inutili indagini di secondo livello.

Di Cataldo A, Dau D, Conte M, et al. Med Sci Monit 2009;15:MT11-8.

P250

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF VANILLYLMANDELIC ACID AND HOMOVANILLIC ACID FOR NEUROBLASTOMA: A THIRTY YEAR EXPERIENCE OF ISTITUTO GIANNINA GASLINI

S. Barco, I. Gennai, L. Barbagallo, A. Maffia, D. Bugnone, M. Talio, P. Bonifazio, G. Bazzurro, G. Tripodi, G. Cangemi

Lab. Centrale di Analisi, Istituto Giannina Gaslini, Genova

Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid (HVA and VMA) are catecholamine metabolites that have been using since the 1970s as biomarkers to assist in the diagnosis and follow-up of patients with neuroblastoma (NB), the most common extra-cranial solid tumor in children. In our laboratory we have centralized more than 3000 urines of NB children from 1989 to date from most Italian pediatric centers being the reference laboratory for NB biochemistry of Cooperative Group for NB of AIEOP. Laboratory techniques used for HVA and VMA quantification have changed over thirty years from liquid-liquid extraction (LLE) followed by gas-chromatography (GC) (by using an home made method) to solid phase extraction (SPE) followed by high pressure liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-EC) (the gold standard technology) by using a Bio-rad commercial kit. A retrospective analysis of data obtained allowed us to establish the diagnostic and prognostic value of HVA and VMA for NB. The diagnostic performance of HVA and VMA evaluated by calculating their sensitivity and specificity and by establishing the corresponding ROC curves was excellent at all ages and stages with higher values in stage 3, 4 and 4s. By combination of the two biomarkers the AUCs considerably improved for all stages, in particular reaching the highest value (AUC=1) in stage 4s. The diagnostic performance was significantly different in patients < or > 18 months (0.963 vs 0.923) (P<0.0001) with higher values for younger patients. A large amount of homogeneous data obtained in a 7-year period by using the same (HPLC-EC) analytical technique were used to calculate age related reference intervals and decision limits that is a indispensable tool for a correct interpretation of results together with the correction for creatinine excretion. The best performance as a prognostic marker was obtained in multivariate analysis by the HVA/VMA ratio in localized NB without N-myc amplification. In conclusion, the determination of urinary HVA and VMA is a rapid, non-invasive and cost effective tool for the management of NB. An accurate determination of these two analytes by HPLC-EC is strongly recommended for a laboratory support to the pediatric oncologists.

P251

MARKERS PREDITTIVI DI DANNO RENALE NELLE GRAVIDANZE COMPLICATE DA PATOLOGIE IPERTENSIVE

C. Cosma¹, S. Visentin², M. Zaninotto¹, D. Faggian¹, M. Plebani¹

¹U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova, Italia

²Dip. della Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova, Italia

Introduzione e scopo dello studio: Obiettivo dello studio è la valutazione di marcatori urinari nell'ambito di patologie ipertensive materne, quali l'ipertensione gestazionale e la preeclampsia, ed il loro ruolo predittivo all'inizio del terzo trimestre di gravidanza.

Materiali e metodi: Sono state arruolate 16 gravide con patologie ipertensive insorte dopo la 20^a settimana di gestazione e 50 controlli afferenti alla Clinica Ginecologica e Ostetrica dell'Università degli Studi di Padova. Sono stati raccolti e congelati un campione di urine all'arruolamento e al parto. Sono stati analizzati i seguenti parametri NGAL, creatinuria, acido urico, albuminuria, proteinuria, KIM-1 e sono stati calcolati i rapporti: NGAL/creatinuria, albuminuria/creatinuria (ACR), proteinuria/creatinuria (prot/crea).

Risultati: nelle urine raccolte all'arruolamento delle pazienti ipertese, risultavano significativamente aumentate, rispetto ai controlli, albuminuria ($p=0.0017$), proteinuria ($p=0.02$) e KIM-1 ($p=0.05$).

Significativi erano il rapporto NGAL/creatinuria ($p=0.04$), con valori maggiori nei controlli, l'ACR ($p=0.002$) e il prot/crea ($p=0.04$), con valori maggiori nelle pazienti ipertese. Sempre nelle pazienti ipertese, i valori di NGAL all'arruolamento risultavano significativamente inferiori che al parto ($p=0.001$), i valori di creatinuria significativamente superiori ($p=0.05$) e il loro rapporto significativamente diminuito ($p=0.02$). Sono risultati aumentati in modo statisticamente significativo anche il rapporto prot/crea ($p=0.04$) e l'acido urico ($p=0.05$). È stata inoltre dimostrata, all'arruolamento, una correlazione tra il rapporto prot/crea e lo spessore intima-media dell'aorta fetale nelle pazienti ipertese ($p=0.002$, $r^2=0.65$), così come tra KIM-1 e il peso alla nascita dei feti nati da madri ipertese ($p=0.003$, $r^2=0.74$).

Conclusioni: pur considerando che la bassa numerosità del gruppo dei casi costituisce un limite di questo studio, si può affermare che il dosaggio urinario di NGAL e KIM-1 e il semplice calcolo dei rapporti prot/crea, ACR ed NGAL/creatinuria può rappresentare una valida alternativa alla proteinuria delle 24 h nella diagnosi delle patologie ipertensive della gravidanza, e anzi consentire una diagnosi precoce in pazienti ancora asintomatiche. Inoltre, tali marcatori possono essere predittivi di un outcome fetale avverso.

P252

EVALUATION OF MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA DISEASE PROGRESSION BY SERUM MESOTHELIN DETECTION LEVELS

M.G. Vivaldi¹, E. Battolla¹, A. Vignani², P.A. Canessa³, P. Ferro⁴, R. Cocilovo¹, P. Dessanti⁴, G. Masini⁴, F. Via¹, R. Lanzoni¹, M.C. Franceschini⁴, A. Valentino⁴, M.P. Pistillo⁵, F. Fedeli⁴, S. Roncella⁴

¹U.O. Laboratorio di Patologia Clinica, ASL5, La Spezia

²U.O. Oncologia Medica, ASL5, La Spezia

³U.O. Pneumologia, ASL5, La Spezia

⁴U.O. Anatomia ed Istologia Patologica, ASL5, La Spezia

⁵Sez. Epigenetica dei Tumori, IRCCS AOU San Martino-IST, Genova

Objective: Malignant Mesothelioma (MM) is an aggressive tumour with increasing incidence in La Spezia in the next years. MM patients have a median survival of less than one year post diagnosis despite current therapeutic modalities that include surgery, chemotherapy and radiotherapy. Evaluation of the response can be difficult so the availability of a soluble tumour marker which could reflect the tumour burden might be of importance in clinical practice. Detection of serum mesothelin (s-SM) has been approved by the US FDA for MM disease diagnosis and monitoring.

In this work we analyzed the levels of s-SM in MM and evaluated its trend in the disease progression.

Methods: The study was approved by the Regional Liguria Ethics Committee and the written informed consent was obtained from all patients.

The study included 20 consecutive MM patients (17 male, 3 female; 16 epithelioid, 3 sarcomatoid, 1 biphasic) recruited at the Oncology Division (ASL5 La Spezia, Italy) between March 2011 and January 2013. All patients received first line chemotherapy (pemetrexed plus a platinum salt) and those in response or stable disease received pleurectomy/decortication, or followed chemotherapy up to 6 cycles. Second line chemotherapy with pemetrexed or gemcitabine or vinorelbine was allowed in disease progression. Evaluation of disease progression was performed by CT.

s-SM was measured in duplicate by the "MesoMark" ELISA kit (Cis-Bio International Gif/Yvette; Fr) according to manufacturers' instructions.

Results: Of twenty MM studied, five showed s-SM \leq the cut-off point of 1.08 nM (Ferro P. et al, 2013) at diagnosis and remained negative during the follow up. Fifteen MM showed s-SM $>$ the cut-off point and eight MM had disease progression. Among them, 7 (88%) MM had increased levels of s-SM (mean of % increased level: 265.8; range: 106.5/714.6) whereas in 1 (12%) MM these levels remained stable. In contrast, all 7 MM, with no evidence of disease recurrence, had stable values of s-SM (mean of % increased level: -25.1; range: -48.1/9.7).

Conclusion: Increased s-SM levels might be a useful adjunctive test for monitoring disease progression in MM. However, further investigation in a larger cohorts of subjects will be required.

Ferro P, et al. Anticancer Res 2013;33:2707-13.

P253

THE ROLE OF IL-10/IL-6 RATIO IN THE MASQUERADE SYNDROMES

M. Brugia¹, F. Balducci¹, G. Gresti², V. Pirani², F. Zicarelli², P. Neri²

¹*Clinical Biochemistry and Microbiology Laboratory Hospital of Ancona*

²*Ophthalmology Department, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy*

The primitive intraocular lymphoma (PIOL) is a rare lymphoid malignancy which stands out among the masquerade syndromes for its therapeutical and prognostical aspects. It often mimics the clinical appearance of an intermediate and/or posterior uveitis, thus rising concern about the possibility to identify it univocally and to set an appropriate and prompt therapeutic scheme.

Even if the only partial response to steroid therapy and the absence of cystoid macular edema (1) can be useful for narrowing the diagnostic spectrum to less uveitic etiologies, cytology, immunochemistry and flow cytometry examination of the vitreous specimen after vitrectomy or vitreous aspiration tap are the main diagnostic techniques to univocally identify the PIOL.

The aim of this study is to evaluate the IL-10/IL-6 ratio measured on vitreous specimen and if it can be used as a useful tool to detect those malignancies.

Materials and methods. From 01 Jan 2014 to 30 May 2015, 9 samples were collected from 6 patients with suspected PIOL followed by the Clinical Ophthalmology of Hospital of Ancona. The samples were analyzed with chemiluminescent methods (Immulite 1000 Medical Systems).

Results. 6 samples had the IL-10/IL-6 ratio high (range 10.46 – 78.8), 3 had IL-10/IL-6 ratio low.

Conclusions. There are still numerous issues to each of these diagnostic tools, for example the paucity of neoplastic cells scattered in a multitude of reactive T-lymphocytes, necrotic cells, debris, and fibrin can also confound the identification of malignant cells, drastically reducing the diagnostic accuracy (2). In this scenario, the evaluation of local production of mainly inflammatory (IL-6) and anti-inflammatory/B cell survival (IL-10) cytokines can be the answer to the need for a test which can increase the accuracy of the PIOL diagnosis. Our preliminary study shows as IL-10/IL-6 ratio measured on vitreous specimen exhibiting a high sensibility and a specificity as in many study (3,4).

1. Fardeau C, Lee CP, Merle-Beral H, et al. Retinal fluorescein, indocyanine green angiography, and optic coherence tomography in non-Hodgkin primary intraocular lymphoma. *Am J Ophthalmol* 2009;147:886-94.

2. Fardeau C, Lee CP, Merle-Beral H, et al. Retinal fluorescein, indocyanine green angiography, and optic coherence tomography in non-Hodgkin primary intraocular lymphoma. *Am J Ophthalmol* 2009;147:886-94.

P254

COMPARISON BETWEEN HUMAN EPIDIDYMIS PROTEIN 4 (HE4) AND CA125 IN EARLY-STAGE ENDOMETRIAL CANCER

M. Montagnana¹, M. Benati¹, E. Danese¹, M. Perfranceschi¹, O. Ruzzenente¹, G.L. Salvagno¹, M. Gelati¹, S. Giudici², M. Franchi², G. Lippi³, G.C. Guidi¹

¹*Dep. of Life and Reproduction Sciences, Clinical Biochemistry Section, University of Verona, Verona, Italy*

²*Dep. of Life and Reproduction Sciences, Obstetrics and Gynaecology Section, University of Verona, Verona, Italy*

³*Lab. of Clinical Chemistry and Hematology, Academic Hospital of Parma, Parma, Italy*

Aim: Endometrial carcinoma (EC) is the most common gynecologic malignancy, accounting in Europe for about 5% of female's cancers. At present, no serum biomarker is adequately efficient to both diagnose or monitor this malignancy. CA125 appears useful to evaluate regression or progression of disease but not in diagnosing. To date, the diagnostic role of Human Epididymis Protein 4 (HE4) in EC is controversial. The aim of this study was to evaluate the diagnostic performance of serum HE4 and CA125 in EC.

Methods: From November 2007 to December 2010, preoperative serum HE4 levels were measured from a cohort of 65 consecutive cases of surgically treated endometrioid EC. Cases were compared to 65 matched controls without a history of cancer or other diseases. Serum levels of CA125 were determined using a chemiluminescent enzyme immunoassay on the Liaison (DiaSorin, Saluggia, Italy). Serum levels of HE4 were determined using the ELISA kit developed by Fujirebio Diagnostic, Inc. (Malvern, PA, USA). For statistical analysis, the chi-square test and Mann-Whitney U test were used. Receiver operator characteristic (ROC) curves were constructed and the area under the curve (AUC) was used as an estimate of the ability of HE4 and CA125 to discriminate between the EC cases and controls.

Results: The median serum concentration of both HE4 and CA125 was significantly higher in patients than in healthy controls (HE4: 72.2 versus 33.6 pmol/L, $p < 0.0001$; CA125: 10.5 versus 8.4 U/mL, $p = 0.021$). More interesting, 21 out of 43 patients in stage I EC (48.8%) showed HE4 values higher than the established cut-off (70 pmol/L) but only 6 out of 43 patients (14%) displayed CA125 concentrations higher than 35 U/mL ($p = 0.0005$). Accordingly, HE4 has a significantly higher AUC as compared with CA125 (0.89 versus 0.57, $p < 0.0001$) for differentiating EC patients in stage I from healthy subjects. **Conclusions:** The results of our investigation confirm that HE4 shows better diagnostic performances than the CA125. In particular, it results more efficient that CA125 in early-stage EC patients. Accordingly, HE4 could be useful for early detection of EC and for monitoring high risk patients.

Bie Y, Zhang Z. Diagnostic value of serum HE4 in endometrial cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol* 2014;12:169.

P255

**VITAMIN D RECEPTOR (VDR) POLYMORPHISM
BSMI AND SMOKE AS RISK FACTORS FOR
MELANOMA IN FRIULI-VENEZIA GIULIA REGION,
ITALY**

S. Cauci¹, C. Buligan², V. Maione², L. Pugnetti¹, M.
Linussio¹, L. Ferino¹, G. Stinco¹

¹Dept. Medical and Biological Sciences, University of
Udine, Udine, Italy

²Dept. Experimental and Clinical Medicine, University of
Udine, Dermatology Clinic, University Hospital. Udine,
Italy

Few studies have directly addressed the relationship between the vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and the incidence and/or prognosis of melanoma, in spite of increasing evidence of vitamin D implications in melanoma. Additionally, the role of smoking is presently a highly debated issue in melanoma studies.

We explored in a case-control study the role of VDR-BsmI polymorphism and lifestyles factors particularly smoking habits in relation to melanoma in general and specifically metastatic melanoma. Our study focused on a geographically restricted population (Friuli-Venezia Giulia Region located in the extreme Northern-East Italy) at the highest prevalence for melanoma in Italy.

Our main findings were: A) a 3-fold higher frequency of bb genotype was found in MetM compared to NMetM (OR 3.18, P=0.021); B) past smoking for ≥ 20 yrs was an almost 4-fold risk factor for having malignant melanoma in respect to controls (OR=3.71, P=0.010), and an almost 5-fold risk factor for having a MetM in respect to NMetM (OR=4.96, P=0.007); C) large ORs were observed by use of combined variables including the VDR-BsmI genotype and duration of smoking, specifically, by comparing MetM with NMetM in regard to bb homozygosity combined with ≥ 20 yrs smoke ever (OR=8.62, P=0.042) and Bb+bb genotype combined with ≥ 20 yrs smoke ever (OR=6.27, P=0.001).

This is the first Italian study (to our knowledge) demonstrating that a specific combination of genetic background and smoking habits is a strong risk factor for MetM. Our research may have implications for malignant melanoma prevention and clinical management strategies in melanoma.

P256

**ASSOCIATION OF FOKI POLYMORPHISM IN THE
VITAMIN D RECEPTOR GENE AND PROSTATE
CANCER IN FRIULI-VENEZIA GIULIA REGION
PATIENTS**

S. Cauci¹, F. Migliozi², C. Giovanni², M. Linussio¹, L.
Pugnetti¹, C. Trombetta²

¹Dept. Medical and Biological Sciences, University of
Udine, Udine, Italy

²Dept. Urology Clinic, Cattinara Hospital, University of
Trieste, Trieste, Italy

Increase evidence points to the vitamin D endocrine system as crucial modulator of prostate cancer risk. Alterations in vitamin D serum levels, and polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR), could have a role in the pathophysiology of prostate cancer. To our knowledge no study explored the association of VDR-FokI polymorphism (rs2228570, wild F allele, C nucleotide; mutated f allele, T nucleotide) and lifestyle non-genetic risk factors with prostate cancer in the Friuli-Venezia Giulia (FVG) Region population.

We aimed to evaluate FokI polymorphism in VDR gene (VDR) and behavioral/environmental risk factors in the prostate cancer patients, and to analyze the interplay of genetic and non-genetic risk factors.

In a pilot study, we enrolled 34 prostate cancer patients. Medical history and the exposition to putative risk factors were evaluated by medical records and ad-hoc questionnaires. FokI polymorphism was detected by PCR-RFLP.

The FF genotype was found in 12/34 (35.3%), the heterozygous Ff genotype in 11/34 (32.4%), and the ff genotype in 11/34 (32.4%) of patients. By comparing our data with figures reported in a previous investigation by Colombini et al. 2015 performed in the healthy male Italian population reporting the following VDR-FokI genotypes frequencies: FF 40.2%, Ff 44.1%, ff 15.7%; we inferred that the ff homozygous genotype was approximately 2-fold more frequent (P=0.02) in prostate cancer patients than in healthy controls, whereas the FF genotype had a tendency for protection.

In conclusion, preliminary results seem to indicate that genetic background related to VDR could be crucial for prostate cancer risk in Northern Italy.

1. Colombini A, Brayda-Bruno M, Ferino L, et al. Gender differences in the VDR-FokI polymorphism and conventional non-genetic risk factors in association with lumbar spine pathologies in an Italian case-control study. *Int J Mol Sci* 2015;16:3722-39.

P257

ANALYSIS OF EGFR KINASE-DEPENDENT AND KINASE-INDEPENDENT ROLES IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA

L. Murgia¹, F. Sanges¹, S. Ena², G. Pira², M.G. Uras³, L. Tanca⁴, A. Asunis⁵, M.R. Muroi¹, C. Carru², M.R. De Miglio¹

¹Dep. of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Sassari, Italy

²Dep. of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, Italy

³Dep. of Pathology, AOU Sassari, Sassari, Italy

⁴Dep. Services and Images, Regional Hospital G.Brotzu, Cagliari

⁵Dep. of Medicine Oncology, "A. Businco" Oncologic Hospital, ASL Cagliari, Cagliari, Italy

Clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) has been widely investigated for Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) protein expression, a common occurrence in CCRCCs. Although recent studies claimed for its potential prognostic significance, a predictive role of EGFR expression has never been established, since genetic evidences of EGFR gene activating mutations and/or gene amplification have been rarely confirmed in the literature. Therefore, so far, EGFR-targeted therapies in clinical trials have been demonstrated unsuccessful.

New evidences have been given about the interactions between EGFR and Sodium Glucose co-Transporter-1 (SGLT1), in the maintenance of glucose basal intracellular level, favouring cellular growth and survival, thus attributing a new functional role to EGFR, regardless of its kinase activity.

Aim of our study was to perform an extensive investigation of genetic changes and functional kinase activities in a series of EGFR-positive CCRCCs, and to elucidate the correlation between EGFR and SGLT1 protein expressions.

Our study demonstrates that EGFR protein overexpression is a recurrent event in CCRCCs and gene expression profile shows the presence of gene overexpression only in the 38.2% of CCRCCs. FISH analysis reveal the absence of EGFR amplification and high polysomy of chromosome 7. Moreover our data showed that SGLT1 is frequently overexpressed in CCRCC EGFR-positive. Since the activation of downstream EGFR pathways is found in about 77% of SGLT1-positive CCRCC, it is conceivable that the EGFR kinase and non-kinase functions can be carried out independently of each other. Therefore the interaction between EGFR/SGLT1 might be a novel therapeutic target for cancer treatment.

Acknowledgement

This work was supported by a grant "Fondazione Banco di Sardegna", Italy.

P258

HIGH FREQUENCY OF PIK3CA MUTATIONS IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

S. Ena¹, G. Pira¹, M.R. Muroi², L. Murgia², F. Sanges², P. Cossu Rocca¹, S. Orrù³, M.G. Uras⁴, C. Carru¹, M.R. De Miglio²

¹Dep. of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, Italy

²Dep. of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Sassari, Italy

³Dep. of Pathology, "A. Businco" Oncologic Hospital, ASL Cagliari, Cagliari, Italy

⁴Dep. of Pathology, AOU Sassari, Sassari, Italy

Breast cancer is a genetically and clinically heterogeneous disease. Triple Negative breast cancer (TNBC), which accounts for 12-24% of all breast carcinomas, is defined by lack of immunohistochemical expression of ER, PR and HER2. From a clinical point of view, TNBC is characterized by earlier onset, poor prognosis and limited therapeutic options, and chemotherapy is currently the mainstay of systemic treatment for these patients. Therefore, these breast cancer subtypes represent a priority target of therapeutical research.

The PI3K/AKT signaling pathway is the most recurrently altered pathway in breast cancer and appear to have cancer subtype specificity. In particular, PIK3CA mutations were more frequently showed in hormone receptor positive and HER2 positive breast cancers than in TNBC. More recent studies identified PI3K pathway alterations, comprising mainly PIK3CA mutations, in a large series of TNBC; moreover, PIK3CA mutations were also more frequently identified in TNBC homologous molecular subtypes, i.e. basal-like breast cancers.

Aim of our study was to investigate the mutational status of PIK3CA, EGFR, AKT1, KRAS, and BRAF and the protein expression of PTEN in a large series of TNBC. Mutational analysis were limited to well established activating mutations for each gene. PIK3CA gene mutations were detected in 24.7% of tumors, with 8.2% on exon 9, and 15.5% on exon 20, coding for helical and kinase domain, respectively. No mutations were appreciable for EGFR, AKT1, KRAS, and BRAF genes. PTEN expression loss was identified only in 9% of TNBC.

In conclusion, we demonstrated that PIK3CA gene mutations are common in TNBC (25% of cases), supporting recent experimental experiences. Due to the absence of conventional therapeutic 'targets' in triple negative variants, our study suggests that new PIK3CA-targeted biological treatments might be taken into consideration for TNBC patients.

Acknowledgement: This work was supported by a grant "Fondazione Banco di Sardegna", Italy.

Gordon V, Banerji S. Molecular pathways: PI3K pathway targets in triple-negative breast cancers. Clin Cancer Res 2013;19:3738-44.

P259

PSA VALUE, PSA KINETICS AND DYNAMIC ¹⁸F-CHOLINE POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY/COMPUTED TOMOGRAPHY IN RECURRENT PROSTATE CANCERM.A. Isgro¹, C. Caldarella², G. Bencivenga², V. Rufini², A. Sgambato¹, A. Giordano²¹Institute of General Pathology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome²Institute of Nuclear Medicine, Dept. of Radiological Sciences, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome

PSA elevation in prostate cancer (PC) patients justifies the use of ¹⁸F-Choline Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT) to sensitively detect recurrent disease. However, PSA kinetics such as PSA doubling time (PSAdt) and velocity (PSAvel) are more useful indicators of progression than PSA value alone. PET/CT performed with additional dynamic (Dyn) acquisition of the prostatic bed, although is a time consuming procedure, would be desirable to provide further diagnostic information of local recurrence.

Aim of our study was to verify whether PSA value, PSAdt and PSAvel can be used to establish when to perform additional Dyn acquisition in patients with recurrent PC. Scans of patients with suspected recurrent PC who underwent PET/CT with Dyn acquisition of the prostatic bed and subsequent conventional protocol were reviewed. Last total PSA value (PSA₃) was retrospectively collected; PSAdt and PSAvel were calculated using the online MSKCC prediction tool, on the basis of the last three PSA determinations.

In 27 of 48 patients included, recurrence was evident on both Dyn and conventional acquisition (group 1); in 21 patients, it was evident on the Dyn acquisition only (group 2). PSA₃ and PSAvel were significantly higher (p=0.05 and p=0.02, respectively) in group 1 [median PSA₃ 7.36 ng/mL, interquartile range (IQR) 3.70-22.51; median PSAvel 0.59 ng/mL/month, IQR 0.19-1.29] than in group 2 (median PSA₃ 2.49 ng/mL, IQR 1.79-10.67; median PSAvel 0.20 ng/mL/month, IQR 0.1-0.59). No significant differences were found in PSAdt values. Cut-off values for PSA₃ (15.02 ng/mL) and PSAvel (1.35 ng/mL/month) were assessed by discriminant analysis to establish when Dyn PET/CT could detect additional lesions. In patients with PSAvel lower than the proposed cut-off, Dyn PET/CT should be performed additionally to conventional protocol (sensitivity 100% vs 51.2%, p <0.001), whilst it is not mandatory for patients with PSAvel higher than the cut-off (sensitivity 100% vs 85.7%, p=0.14). Conversely, PSA₃ cut-off does not seem clinically useful to establish if Dyn PET/CT should be performed, because Dyn PET/CT showed a clinical advantage for values both higher and lower than the proposed cut-off (sensitivity 100% vs 51.3%, p <0.001; 100% vs 77.7%, p=0.028, respectively).

P260

STUDIO DEI LIVELLI DI 25-OH VITAMINA D IN PAZIENTI AFFETTE DA CANCRO OVARICOG. Teresa¹, V. Viggiani⁴, M.G. Porpora², L. Manganaro³, A. Angeloni⁴, E. Anastasi⁴¹Servizio di Oncoprevenzione ginecologica, Policlinico Umberto I, Roma²Clinica Ginecologica, Policlinico Umberto I, Roma³Radiologia, Policlinico Umberto I, Roma⁴Laboratorio Patologia Clinica, Policlinico Umberto I, Roma

Il cancro ovarico (CO), è la principale causa di morte per neoplasia ginecologica. Studi recenti mostrano una relazione tra i livelli di 25-OH vitamina D e l'inibizione della carcinogenesi, per i suoi effetti antiproliferativi e pro-apoptotici (1). Scopo di questo studio era di valutare la correlazione tra 25-OH vitamina D e CO, come marcatore diagnostico o di recidiva di malattia. Sono state studiate: 1) 61 donne senza malattie ginecologiche (età media 57 anni); 2) 45 donne affette da malattia ovarica benigna (età mediana 62 anni); 3) 46 donne con recente diagnosi di CO (età media 68 anni); 4) 26 donne di follow-up con CO ricorrente (età media 56 anni); 5) 32 donne di follow-up con CO stabile (età media 59 anni). I livelli di 25-OH vitamina D sono stati quantificati con Lumipulse® G 25-OH vitamina D su LUMIPULSE® G 1200 (Fujirebio, Giappone). Come valore di soglia, identificata mediante analisi della curva ROC, 20,2 ng/ml (73,3% di sensibilità, specificità 84%) è stato scelto corrispondente al limite tra la sufficienza e insufficienza. Bassi livelli di 25-OH vitamina D sono stati osservati in 16/61 (26%) delle donne senza malattie ginecologiche, a 36/46 (80%) delle donne con recente diagnosi di CO e in 11/45 (24%) delle donne con malattie ovariche benigne (p <0,001). Lo studio di follow-up ha mostrato un livello insufficiente di 25-OH vitamina D in 19/26 (73%) donne con CO ricorrente e in 16/32 (47%) delle donne con CO stabile (p <0,0003). In questo studio, abbiamo osservato che le pazienti con CO hanno spesso insufficienti livelli di 25-OH vitamina D rispetto alle donne con patologie ovariche benigne. Le pazienti con CO ricorrente hanno presentato bassi livelli di 25-OH vitamina D rispetto alle donne con malattia stabile. Questo studio suggerisce che il 25-OH vitamina D, grazie alla sua attività antiproliferativa e pro-apoptotica, potrebbe essere considerato un buon indicatore per il management del CO. 1. Webb PM, de Fazio A, Protani MM, et al. Australian Ovarian Cancer Study Group. Circulating 25-hydroxyvitamin D and survival in women with ovarian cancer. Am J Clin Nutr 2015;102:109-14.

P261

IL BIOMARCATORE PIVKA-II RISULTA ESSERE UN BUON INDICATORE NEI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA EPATOCELLULARE

E. Anastasi¹, V. Viggiani¹, B. Colaprisca¹, C. De Vito², G. D' Ettore¹, L. Frati², A. Angeloni¹

¹Dipartimento di Medicina Molecolare, "La Sapienza" Università di Roma

²Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie infettive, "La Sapienza" Università di Roma

L'Alfa fetoproteina (AFP) è considerato un biomarcatore utile per la diagnosi ed il follow-up del carcinoma epatocellulare (HCC). Tuttavia, come molti biomarcatori, AFP mostra incrementi anche in condizioni non oncologiche. Recenti studi hanno messo in evidenza come la proteina nota come indotta da assenza di vitamina K (PIVKA II) sembra avere maggiore specificità rispetto all' AFP nella diagnosi precoce dell' HCC. Per caratterizzare meglio il ruolo di PIVKA-II abbiamo valutato i livelli sierici di PIVKA-II in un gruppo di pazienti affetti da HCC rispetto ad un gruppo di pazienti affetti da patologie epatiche non oncologiche. Nello studio sono stati valutati: 60 campioni sierici di pazienti affetti da HCC, 60 campioni sierici di pazienti affetti da malattia epatica cronica e 60 campioni di siero ottenuti da donatori di sangue. PIVKA-II e AFP sono stati misurati mediante LUMIPULSE® G1200 (Fujirebio-Europe, Belgio). In questo studio, per il PIVKA-II abbiamo considerato come cut-off il seguente valore: 70 mAU . La valutazione di PIVKA-II ha mostrato una positività del 70% in pazienti con HCC e 5% in pazienti con malattie epatiche croniche (p <0,0001), mentre elevati livelli di AFP sono stati osservati nel 55% dei pazienti HCC e nel 47% dei pazienti con epatopatie croniche. AFP. L'analisi ROC combinata dei due analiti ha rivelato una sensibilità più alta (75%) rispetto a quella osservata per i singoli biomarcatori. In conclusione, i nostri risultati dimostrano che come biomarcatore per HCC, PIVKA-II può essere superiore a AFP. Inoltre, è importante sottolineare che la combinazione dei due biomarcatori, valutati dall' analisi ROC, migliora la specificità rispetto ad un singolo marcatore. Questi dati suggeriscono che l'analisi combinata dei due marcatori potrebbe essere uno strumento utile nella pratica clinica.

1. Huang J, Zeng Y. Current clinical uses of the biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Drug Discov Ther* 2014;8:98-9.

P262

APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA: CHI E' COSTEI !!!

G. Trinchese, L.A. Napolitano

S.C. Patologia Clinica, P.O. S. Maria della Pietà, Nola (NA)

Inappropriate use of laboratory tests is a waste of economic and human resources. Laboratory medicine must meet the clinicians' requests but must also tackle inappropriate requests by changing the behavior and helping specialists to use the tests in a evidence-based manner. Appropriateness can become a good way to protect health and at the same time a means of reducing waste. From a retrospective analysis of the requests regarding CEA, AFP, CA 19-9, CA125, CA15-3, Cyfra 21 received by our laboratory from hospital wards in the first nine months of 2014, it emerged the clinician's choice to prescribe more than two tests per request (48.7% of total requests) up to a maximum of six (16%). We have therefore resolved to fight the use of non evidence-based cancer laboratory testing, with the aim of rationalizing the requests and reducing their number, by activating an operating protocol for an evidenced-based request. The specialist will be allowed to require one or at most two analytes, the request will always have to be associated with a diagnosis, and the laboratory test will only be carried out if the diagnosis is consistent with the required test(s). This protocol was activated in December 2014 and, by comparing two homogeneous periods, before and after its activation, we showed that the number of laboratory tests decreased from 2,306 (December 2013-May 2014) to 916 (December 2014 - May 2015), with a percent decrease of 60%. A reduction was also obtained in the number of requests, which decreased from 772 to 414 (-46%), Medicine -60% and Surgery -54.8%, except for Oncology whose requests increased by 20%. The comparison between the two periods shows how the implementation of recommendations and the activation of operating protocols based on scientific evidence has led to a more statistically appropriate use of neoplastic markers although, as it was perhaps expected, the compliance of the specialists with the new model it has not been optimal, despite it having been previously agreed upon, demonstrating that the transfer of scientific evidence into the clinical practice is not simple, logical, sufficient, but certainly needed for improvement medical treatment and cost reduction.

P263

EVALUATION OF THE CLINICAL RELEVANCE OF CAGL GENE POLYMORPHISMS OF HELICOBACTER PYLORI

M. Pelloso¹, C.F. Zambon¹, A. Tessari¹, D. Basso¹, D. Bozzato¹, M. La Malfa¹, A. Marchet², G. de Manzoni³, L. Cristadoro⁴, A. Brandimarte⁴, L. Gerard⁵, D. Nitti², M. Plebani¹

¹Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Italy

²Department of Surgery Oncology and Gastroenterology, University of Padova, Italy

³First Division of General Surgery, University of Verona, Italy

⁴General Surgery, Pieve di Coriano Hospital, Mantova, Italy

⁵General Surgery, Carlo Poma Hospital, Mantova, Italy

Background: cagL gene has been recently proposed as new Helicobacter pylori virulence factor. Polymorphisms at aminoacid58 and 59 of CagL protein showed to be associated with gastric cancer risk in Taiwanese and Indian patients.

Aim: to verify the presence of CagL polymorphisms in Italian subjects infected by Western H. pylori strains and their possible association with gastric cancer.

Materials and methods: We retrospectively selected 542 patients infected by H. pylori strains bearing the cag-pathogenicity island, 146 with gastric cancer (79 male, 67 female; mean age 69 yrs, range 39-88 yrs) and 396 with benign H. pylori associated pathologies (199 male, 197 female; mean age 51 yrs, range 20-78 yrs). Histology was used to diagnose gastric cancer and to evaluate gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia. Helicobacter pylori was cultured from gastric specimens and genomic DNA extracted. A combination of direct sequencing and Real-Time PCR was adopted to investigate cagL polymorphisms.

Results: 13 different CagL amino acidic polymorphisms with a frequency >10% were identified. Only two variants were present at positions 58 and 59 (D58N and E59K) and their frequencies were very different compared to those reported for Eastern strains.

No significant association was found between CagL polymorphisms and gastric cancer or preneoplastic lesions. CagL 58N aminoacid was associated with higher degree of corpus gastritis (Fisher's exact p <0.01).

Conclusions: CagL polymorphisms are not a risk factor for gastric cancer in patients infected by Western H. pylori strains. Our results warrant additional studies to better understand their functional role in determining the pattern of chronic gastritis.

Yeh YC, Chang WL, Yang HB, et al. pylori cagL amino acid sequence polymorphism Y58E59 induces a corpus shift of gastric integrin $\alpha 5\beta 1$ related with gastric carcinogenesis. Mol Carcinog 2011;50:751-9. doi:10.1002/mc.20753.

P264

EVALUATION, BY AUTOMATED MICROSCOPY, OF PATHOLOGICAL ELEMENTS IN THE URINARY SEDIMENT OF PATIENTS AFFECTED BY UROLOGICAL DISEASES.

M. D'Alessandro¹, A. Bachetoni², G. Riitano³, R. Giovannone⁴, S. Tricarico⁴, G.M. Busetto⁴, A.M. Nicoletti¹, B. Evangelista¹, A. Angeloni³, E. De Berardinis⁴

¹U.O. Patologia Clinica, Dip. Chirurgia P.Stefanini, Pol. Umberto I, Sapienza Università' di Roma

²Dip Medicina Sperimentale, Pol. Umberto I, Sapienza Università' di Roma

³Dip. Medicina Molecolare, Pol. Umberto I, Sapienza Università' di Roma

⁴Dip. Urologia, Pol. Umberto I, Sapienza Università' di Roma

Introduction: Urinalysis with sediment examination plays an important role in the diagnosis and monitoring of urothelial malignancy. New technologies as the Automated Intelligent Microscopy (AIM) provide a valid improvement in detecting pathological elements in urine samples of patients with urological diseases and also allow an easy monitoring of the diseases trend. The goal of this study is to evaluate the impact of AIM in the diagnosis of bladder tumors.

Methods: 71 consecutive patients treated from December 2014 to May 2015 at the Department of Urology of Policlinic Umberto I of Rome, were included in this study, 63 M (y 58-89), 8 F (y 54-85). Urinary sediments, performed by IRIS iQ200, an image-based automated urine microscopy analyzer, were retrospectively evaluated and compared with histological grading. The parameters considered were RBC, WBC, transitional cells (TRc) and atypical cells (Atyc) seen as elements with altered dimension or appearance. The patients were divided in 4 groups in relation to histological grading: 7 negative pts, 24 G1 pts, 12 G2 pts, 28 G3 pts. Results: In the negative group we have detected WBC (5/7) and RBC (4/7); In the G1 the presence of WBC (13/24), RBC (16/24), TRc (2/24), Atyc (15/24); in the G2 in all patients RBC e WBC were present, TRc (12/28) and Atyc (8/12); in G3 a steady presence of RBC and WBC, TRc (12/28) and Atyc (27/28). The presence of TRc and especially Atyc are in relation with the severity of disease. Surprisingly there is a presence of atypical cells in the 62% of G1 patients, presence that will be important on early diagnosis.

Conclusions: Urine cytology is the gold standard for the diagnosis of urothelial cancer pathologies, assisted for sure by the examination of the urinary sediment. Our study shows that automated methodologies, as the AIM, which is the result of the technological evolution of the sediments' analysis, can represent a valid resource for urological diagnostic when implemented by experts with a close collaboration of clinician. Moreover long-term storage of data and images is a helpful tool for patient's follow-up.

P265

METAGENOMIC ANALYSIS OF MICROBIOME COMPOSITION IN BREAST CANCER TISSUES

M.V. Esposito¹, M. Nunziato², B. Fosso³, G. Casaburi¹, A. Telese¹, D. Montanaro¹, G. Liguori⁴, M. D'Aiuto⁴, G. D'Aiuto⁴, G. Botti⁴, A. Baldi¹, V. D'Argenio⁵, G. Pesole⁶, F. Salvatore⁷

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

²Department of Sport Sciences, University of Naples Parthenope, Naples, Italy

³Institute of Biomembranes and Bioenergetics, National Research Council, Bari, Italy

⁴Department of Senology, Istituto Nazionale Tumori – IRCCS Fondazione Pascale, Naples, Italy

⁵Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, Naples, Italy

⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari A. Moro, Bari, Italy

⁷IRCCS-Fondazione SDN, Naples, Italy

Background: Breast cancer (BC) is the most common malignancy in females. Despite a low fraction of hereditary forms (about 10%), the majority of BCs are considered sporadic and a number of factors, including familiarity, age, hormonal cycles and diet, have been reported as BC risk factors. The human-associated microbiota varies between individuals and body sites, and is important for maintenance of human health. Indeed, it is largely clarified that its imbalances, i.e. microbial dysbiosis, have been associated to various human diseases, including cancer. The human microbiome can be studied using the features of next-generation sequencing (NGS), and its metagenomic applications. This has allowed the investigation of the microbial composition in several body areas and in association to many diseases to better understand its relationships with the human host.

Objectives: The aim of this work was to fully characterize, using a NGS-based method, the breast tissue microbiome to identify a microbial signature related to BC or to specific BC prognostic features, with particular attention to the exposition to other environmental factors.

Methods: Thirty four women affected by BC were enrolled. Tumor tissues and non-tumoral adjacent tissues were collected from each subject, for a total of 68 samples. Sequencing of the variable V4-V6 regions of the 16S rRNA gene was performed by Illumina MiSeq System. Data analysis was carried out using QIIME tool and, to consolidate results and statistics, will be reanalyzed by BioMaS pipeline.

Conclusions: Comparison between healthy and tumor tissues showed different bacterial composition and richness. Interestingly, we found that also BRCA mutation status, familiarity and tissue histology can influence microbiome composition. Moreover, breast tissue microbiome seemed to be related to the exposure to several environmental factors, even if considered in cluster. Taken together, our findings suggest a previously unrecognized link between tissue dysbiosis and breast cancer, which could have potential clinical implications.

P266

MALE AND BREAST CANCER: AN ERRONEOUS UNDERESTIMATION

M.V. Esposito¹, M. Nunziato², F. Starnone¹, A. Telese¹, M. D'Aiuto³, G. D'Aiuto³, V. D'Argenio⁴, F. Salvatore⁵

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples. Dept. of Sport Sciences, University Parthenope, Naples, Italy

³Dept. of Senology, Istituto Nazionale Tumori – IRCCS Fondazione Pascale, Naples, Italy

⁴CEINGE-Biotecnologie Avanzate. Dept. of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University Federico II, Naples, Italy

⁵CEINGE-Biotecnologie Avanzate. Dept. of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University Federico II. IRCCS-Fondazione SDN, Naples, Italy

Breast cancer (BC) is one of the most common malignancy worldwide with an incidence that increases 2% per year [1]. It is reported that, with ovarian cancer, is the second cause of death due to a neoplastic disease affecting women. About 90% of BCs are considered sporadic, whereas the remaining account for hereditary form. Among these, a major percentage of cases are related to germline mutations in two genes, BRCA1 and BRCA2 [2]. The risk of developing BC escalates in people carrying a germline predisposing mutation [2]. Furthermore, male carriers of BRCA1/2 mutations are susceptible to cancer; however, their risks remain poorly understood and, consequently, their optimal clinical management has not yet been defined [3]. In contrast to women who have a greater lifetime risk of cancer if carry mutations in the BRCA1 gene, male breast cancer is generally related to BRCA2 mutations. The lifetime risk of male BC in BRCA2 mutation carriers is up to 100 times higher than in the general population and, generally, these men have a poorer prognosis.

In this context, we carried out a large NGS-screening [4] and identified a causative BRCA2 mutation in a man. This patient is affected by early-onset BC (37 yr.), and has a positive family history for multiple cancers, including ovarian cancers. We found that he carries the BRCA2 c.2808_2811delACAA p.K936Qfs*21 frameshift mutation. Subsequent familial screening allowed the identification of other at risk relatives and highlighted the inheritance of the mutation from the paternal branch of the proband.

This case report shows the importance to look for BRCA mutations also in male. Even if BC is rare in men, when it happens, their risk to carry germline predisposing mutations is very high. In addition, in BC families, healthy men can carry the familial mutation and so they can have an increased lifetime risk of a variety of cancers (BC, prostate or gastrointestinal cancers). Finally, their offspring can inherit the mutation. All the above should be carefully evaluated during BC familial screening to identify all the at risk family members to be involved in cancer surveillance programs.

1. Narod SA. Nat Rev Clin Oncol 2012;9:460-70.

2. Lalloo F, et al. Clin Genet 2012;82:105-14.

3. Liede A, et al. J Clin Oncol 2004;22:735-42.

4. D'Argenio V, et al. Clin Chim Acta 2015;446:221-5.

P267

EVALUATION OF BONE METABOLISM MARKERS IN PATIENTS WITH CHRONIC BENIGN AND MALIGNANT PANCREATIC DISEASES

A. Barassi¹, R. Pezzilli², L. Massaccesi³, G. Goi³, C.A.L. Damele¹, R. Stefanelli⁴, A. Leone⁴, G.V. Melzi d'Eril¹

¹Department of Health's Sciences, University of Milan, Milan, Italy

²Pancreas Unit, Department of Digestive System, Sant'Orsola-Malpighi Hospital, Bologna, Italy

³Department of Biomedical, Surgical and Dental Sciences, University of Milan, Milan, Italy

⁴Central Laboratory, San Paolo Hospital, Milan, Italy

Introduction: There are no studies comparing some of the most important markers, such as vitamin D, parathormone (PTH), osteocalcin, bone alkaline phosphatase and calcium, in patients with chronic benign and malignant pancreatic diseases.

Aim: To comparatively evaluate serum markers of bone metabolism in patients with chronic pancreatitis and in those with ductal pancreatic adenocarcinoma.

Material and Methods: Sixty-three consecutive subjects were studied: 30 patients with a firm diagnosis of chronic pancreatitis and 33 having histologically confirmed pancreatic adenocarcinoma. Serum 25-hydroxyvitamin D, bone alkaline phosphatase, osteocalcin, PTH and calcium were determined using commercially available kits.

Results: Taking into consideration the clinical variables of all 63 patients studied, 25-hydroxyvitamin D was inversely correlated with only the body mass index (BMI) (P=0.007) whereas it was not correlated with age (P=0.583) or fecal elastase-1 concentrations (P=0.556). Regarding the other substances studied, PTH was positively correlated with only the age of the patients (P=0.015). Of the five substances studied, only bone alkaline phosphates were significantly different (P <0.001) between patients with chronic pancreatitis and those with pancreatic ductal adenocarcinoma. Within the two groups of patients, the 23 patients with chronic pancreatitis without diabetes mellitus had serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D significantly lower (P=0.045) than those with chronic pancreatitis having diabetes mellitus whereas smokers with pancreatic ductal adenocarcinoma had serum concentrations of calcium significantly higher (P <0.001) as compared to non-smokers.

Conclusions: Altered bone metabolism seems to be associated with chronic diseases of the pancreas; however, the mechanism should be better elucidated.

P268

MUTAZIONI DEL GENE PALB2 IN PAZIENTI CON HBOC: LA NOSTRA ESPERIENZA

M.T. Vietri¹, G. D'Elia², M.L. De Paola², G. Caliendo², V. De Stefano², M. Cioffi³, A.M. Molinari³

¹U.O.C. Patologia clinica e molecolare, Diagnostica molecolare - Tumori ereditari, A.O.U. Seconda Università degli studi di Napoli

²Patologia clinica, Dip. di Biochimica, Biofisica e Patologia generale, Seconda Università degli studi di Napoli

³U.O.C. Patologia clinica e molecolare, A.O.U. Seconda Università degli studi di Napoli

Il gene PALB2 è mutato in circa l'1-3% dei casi di carcinoma della mammella e dell'ovaio ereditari (HBOC), inoltre mutazioni di PALB2 predispongono al carcinoma mammario maschile e pancreatico.

L'obiettivo del nostro studio è stato valutare la presenza ed il significato patogenetico di variazioni del gene PALB2 in pazienti affetti da HBOC. Abbiamo reclutato 151 pazienti (F=143, M=8), 132 con carcinoma mammario, 10 mammario bilaterale, 3 ovarico, 5 mammario e ovarico e 1 mammario e della cervice uterina. Per i pazienti mutati l'analisi è stata estesa anche ai familiari.

L'analisi molecolare è stata condotta amplificando e sequenziando il gene PALB2.

L'analisi condotta ha mostrato la presenza di 5 nuove variazioni di sequenza. Una mutazione frameshift, c.1285_1286delAinsTC (p.I429SfsX12), una di stop, c.1919C>A (p.S640X), una variante missenso, c.3047T>C (p.F1016S) e 2 varianti introniche, c.*146A>G e c.-62G>T.

Nel nostro studio la percentuale di pazienti mutati in PALB2 è del 3,3%, in accordo con i dati in letteratura.

Le nuove varianti identificate sono state analizzate con i programmi di predizione PolyPhen-2, SIFT, A-GVGD e NN SPLICE. L'analisi in silico ha riportato la variazione c.3047T>C (p.F1016S) deleteria sulla funzione proteica, che la c.-62G>T altera il sito di splicing e la c.*146A>G come neutra. La variazione c.3047T>C (p.F1016S) altera l'associazione tra PALB2 e BRCA2, è stata identificata in una paziente con carcinoma mammario con 1 caso di carcinoma pancreatico in famiglia.

La variante c.-62G>T determina una precoce alterazione dello splicing e la sintesi di una proteina non funzionante, è stata osservata in una paziente con carcinoma mammario e della cervice uterina.

La mutazione c.1285_1286delAinsTC (p.I429SfsX12) è stata identificata in 1 uomo con carcinoma mammario.

Studi in vitro e di co-segregazione sono necessari per confermare l'effetto patogenetico delle nuove varianti nell'HBOC.

I dati emersi confermano che mutazioni di PALB2 sono coinvolte nella predisposizione al carcinoma mammario maschile e pancreatico. L'analisi mutazionale del gene PALB2 dovrebbe essere eseguita di routine in famiglie HBOC, non mutate in BRCA1/2, per predisporre adeguate misure di prevenzione nei soggetti sani e piani terapeutici alternativi nei pazienti già affetti.

P269

QUANTIFICAZIONE DELLA COMPONENTE MONOCLONALE (CM): L'ESPERIENZA DEL LABORATORIO DI BAGGIOVARA

P. Natali, G. Patelli, D. Carra, S. Tagliavini, F. Zambelli, M. Varani, T. Trenti

S.C. Medicina di Laboratorio, NOCSAE Modena

Premessa: La quantificazione della CM offre informazioni utili all'inquadramento diagnostico e al monitoraggio delle Gammopatie Monoclonali e presenta difficoltà evidenziate nella letteratura specialistica, in particolare in zona β . Non esistono univoche indicazioni procedurali per complessità determinate da diversi fattori: a) posizionamento dei limiti di integrazione e variabilità intra/interoperatore; b) scarsa linearità per eccesso di antigene; c) imprecisione della misura delle PT; d) scarsa correlazione tra AGE e CZE; e) caratteristiche strutturali della CM specialmente IgM.

Ulteriori complicazioni sono rappresentate dalla presenza di proteine comigranti (Transferrina in $\beta 1$ e Frazione del Complemento C3 in $\beta 2$) e di un fondo policlonale in zona γ .
Materiali e metodi: La CM viene rilevata mediante corsa elettroforetica in CZE, valutata con immunosottrazione e confermata con IFE su AGE (Sebia). La quantificazione avviene delimitando manualmente il picco omogeneo mediante limiti che consentono di calcolare l'area sottesa in percentuale tramite software, moltiplicata poi per il valore delle PT (AU680 Beckman).

Risultati: Nel 2014 il Corelab di Baggiovara (AUSL di Modena) ha eseguito 162.786 elettroforesi, di cui 11.695 (7,2%) presentavano una CM. Sul totale delle CM rilevate, 2.546 (21,8%) si collocava in zona β . Il 61,5% delle CM totali rilevate era <5 g/l; il 31,7% era compresa tra 5 e 15 g/l; il 5,5% era tra 15 e 30 g/l; l'1,4% era >30 g/l. La CM viene sempre identificata e quantificata, con maggiore difficoltà quando posta in zona β soprattutto se di modesta entità, in quanto risente del bias dovuto alla presenza delle proteine comigranti, bias che si riduce proporzionalmente all'aumentare della consistenza del picco rilevato.

Conclusioni: La concentrazione minima di CM refertata è 5 g/l. Non si refertano valori di CM <5 g/l per la scarsa precisione dei dati ottenuti in questo ambito di valori a fronte delle importanti ricadute che anche piccole variazioni potrebbero avere sull'inquadramento clinico del paziente. Le problematiche connesse alla misurazione risultano più contenute se la determinazione è effettuata con la stessa tecnologia e nello stesso laboratorio.

Vernocchi A, Dolci A. Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:199-207.

P270

POTENZIALE RUOLO DEI BIOMARCATORI DI NEOPLASIE POLMONARIG. Priolo², G. Martinasso², M. Lucchiari², M. Loiacono², L. Buffoni³, A. Celano³, A. Mattei⁴, G. Mengozzi²¹A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino - Presidio Molinette²Lab. di Biochimica Clinica³Dip. Oncologia Medica 1 e 2⁴Dip. Cardiovascolare e Toracico-Pneumologia

Il carcinoma del polmone è una patologia aggressiva, difficile da curare ed una diagnosi precoce è importante, poiché la prognosi dipende dalla tempestività di essa. Sia nei microcitomi (SCLC) che nei NSCLC lo stadio precoce non presenta sintomi netti e precisi quindi spesso la patologia è diagnosticata in stadi avanzati quando le possibilità di guarigione sono compromesse. Il carcinoma non presenta un biomarcatore specifico in grado di supportare la diagnosi strumentale. Nel nostro lavoro si è presa in esame una popolazione di 140 pazienti affetti da carcinoma afferenti al Centro Oncologico del nostro ospedale e 20 portatori di fibrosi polmonare idiomatica (FPI). Si sono testati tre marcatori "classici", CEA, Cyfra 21-1 ed NSE mediante ricorso alla piattaforma automatizzata Cobas "6000" (ditta Roche) e si è proceduto al dosaggio del proGRP e del KL6 utilizzando il sistema Lumipulse G1200 (ditta Fujirebio). I dati ottenuti sono stati confrontati con il referto istologico ricavato da biopsia. In base ad esso sono risultati realmente affetti da SCLC 16% dei soggetti, mentre forme NSCLC sono state il 55%. Il proGRP è risultato essere un promettente marcatore per SCLC in quanto il 94.4% dei pazienti con microcitoma ha presentato valori elevati (sensibilità del 89.5%, specificità del 97.2%). Con metastasi disseminate, i valori sono risultati >200 pg/mL. Anche la curva ROC indica una buona capacità di discriminazione (AUC=0.933). La performance del marcatore è risultata superiore a quella del NSE (valori elevati soltanto nel 55.5% dei soggetti con SCLC). Soltanto nel 25.8% dei pazienti affetti da NSCLC si sono riscontrati valori di proGRP superiori a 100 pg/mL. CEA e CYFRA 21-1 non hanno fornito valori discriminanti per supportare la diagnosi avendo scarsa sensibilità. Per quanto riguarda il KL6 i risultati ottenuti sembrano interessanti con una sensibilità del 90.5% (specificità: 68.3%) nei casi di FPI primitiva e del 66.7% (specificità 68.8) nelle secondarie al tumore. Quindi i marcatori tradizionali hanno un ruolo limitato nella diagnostica del carcinoma mentre il proGRP sembra essere importante come supporto ad essa e nella discriminazione tra SCLC e le altre forme tumorali. Il KL6 è utile nei casi di fibrosi (primitiva e secondaria) ma il numero esiguo di soggetti testati impone un ulteriore approfondimento.

P271

HEMOGLOBIN DETERMINATION ON GEM 4000 PREMIER (POINT OF CARE SYSTEM): PERFORMANCE EVALUATION AND COMPARISON TO REFERENCE LABORATORY SYSTEM (DASIT XE)

N. Bettinardi, A. Marinoni, M. Cusenza, D. Elia, E. Torresani

Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

Background: One of the special features of PoCT is the possibility of immediate therapeutic intervention on the patient; about hemoglobin (Hb) concentration, one of the most frequently used procedures for its measuring in critical wards (intensive care, emergency department, surgical room) is the determination on PoCT. We expected that result from PoCT should be the same of this one obtained with instrument laboratory, also as regards the subsequent monitoring.

Aim: To verify if performance and result concerning Hb obtained on PoCT and on laboratory instrument are comparable.

Materials and method: In our hospital we have 21 PoCT instruments GEM 4000 Premier (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Blood samples (arterial or venous) were obtained from patients both admitted to our hospital and outpatients, and preserved in EDTA tubes or in heparin syringe. The performances measured on GEM 4000 were: within-day (n=21) and total (n=21) CVs on two Hb levels (normal and low concentration). Inaccuracy was calculated as: difference among samples (arterial or venous blood) and container (tube or syringe) (n=38); calibration stability (n=2, normal and low concentration); linearity (recovery) on tube and syringe (n=2, normal and low concentration). Method comparison: arterial and venous blood samples, preserved in tube and/or syringe (n=115); we calculated linear regression and Bland-Altman plot.

Results: Within-day CV ranged from 0.7% to 1%; total CV ranged from 0.7% to 0.9%. About the different containers, when blood was stored in tube, the difference concentration of Hb (GEM 4000 and DASIT XE) was 4.3%, while if blood was stored in syringe the difference was 3.1%. No significant differences was found in the 10 days after calibration (mean difference 0.10%). Linearity: recovery ranged from 95% to 105%. Method comparison: regression line = $1x + 0.57$. Bland-Altman plot showed a bias = -0.6 (95% CI from -0.69 to -0.51).

Discussion and conclusion: Verifying that analytical performance are more than satisfactory, the agreement among the laboratory hematology system (DASIT XE) and PoCT (GEM 4000) is more than acceptable. Then, the same therapeutic decision (e.g. blood transfusion) can be done using Hb concentrations both from PoCT and laboratory instrument.

P272

I GLUCOMETRI E L'ESAME DA CARICO ORALE DI GLUCOSIO (OGTT): UN CONNUBIO POSSIBILE?

B. Bernardi, N. Jordaney, A. Panetto, M. Di Benedetto

S.C. Analisi Cliniche, Osp. U. Parini, Aosta

Nell'OGTT il tempo tra prelievo e determinazione della glicemia basale è cruciale per la prosecuzione tempestiva del test e per ridurre l'effetto della glicolisi. Le raccomandazioni SIBioC ammettono l'uso di glucometri purché sia verificato il valore di glicemia cut-off del proprio laboratorio e le prestazioni siano monitorate nel tempo.

Scopo: confronto tra due glucometri e i metodi automatizzati usati nella nostra struttura, per limitare la fase preanalitica dell'OGTT, data la distanza del centro prelievi dal corelab.

Dal 2012 il nostro laboratorio, verificata la concordanza tra emogasanalizzatore (EGA) ABL825 Radiometer e ModularP Roche (esokinasi-HK), utilizza l'EGA nella prima determinazione dell'OGTT per evitare le criticità esposte.

Metodi: I fase: confronto glucometro ACCUCHECKII (ACII,Roche) con EGA. II fase: verifica concordanza EGA / Cobas8000 Roche (sostituto del ModularP, metodo HK), confronto glucometro STATSTRIP (SS, Menarini) / EGA. Con SS è stato anche valutato un gruppo di gravide. Risultati: I fase: n=40, ACII: glicemia media 105, max 186, min 75 mg/dL. EGA: media 106, max 171, min 81 mg/dL. Differenza media (ACII-EGA): -2,3 Limits of Agreement (LOA) 11,0 e -15,6 mg/dL. II fase: n=44, SS: media 90, max 175, min 61 mg/dL. EGA: media 97, max 193, min 72 mg/dL. Differenza media (SS-EGA): -7,8, LOA 5,9 e -21,5 mg/dL. Gravide: n=30, SS: media 83, max 196, min 65 mg/dL. EGA: media 90, max 206, min 72 mg/dL. Differenza media (SS-EGA): -4,8, LOA 5,5 e -15,2 mg/dL. Griglia di Clarke: i dati dei due glucometri si situano nella zona A (entro il 20% dal metodo di riferimento). Adattando la griglia di Shermok all'OGTT, il numero di osservazioni che porterebbero a decisione clinica discordante rispetto all'EGA è simile per la popolazione non selezionata (ACII 22,5, SS 22,7%), mentre per le gravide è del 10%.

Conclusioni: i dati dei glucometri risultano accettabili con la griglia di Clarke, confermando la possibilità di utilizzo ospedaliero, grazie anche alla connettività degli strumenti; possibile criticità: la manualità non immediatamente assimilabile. Ai fini dell'OGTT, tuttavia, la concordanza merita ulteriori indagini.

Carta M, Mosca A, Lapolla A et al. Raccomandazioni 2015 per l'esecuzione dell'esame da carico orale di glucosio. *Biochim Clin* 2015;39:135-40.

P273

HBV TRASMISSION FROM AN OCCULT CARRIER WITH FIVE MUTATIONS IN MAJOR HYDROFILIC REGION OF HBsAg TO A IMMUNOSOPPRESSED PLASMA RECIPIENT

A. Petruzzello¹, G. Loquercio¹, S. Marigliano¹, N. Coppola², G. Cozzolino¹, G. Pasquale², C. Cacciapuoti¹

¹UOC Medicina Trasfusionale, Dip. Ematologia, IRCCS Fondazione Pascale, Napoli

²Clinica Malattie Infettive, Sun - Seconda Università di Napoli

Introduction: Although the risk of HBV infection through transfusion has been recently reduced, post-transfusion hepatitis are still an emergency, for the more frequent appearance of HBV mutations in the MHR region of the pre S/S gene.

We here describe the case of a blood donor HBsAg/NAT neg. with five mutations which caused an acute hepatitis, HBsAg neg./HBV DNA pos. in an immunodepressed patient plasma transfused.

Case description: A blood donor (SV), 56 years old, Italian, male, donor since 2008, not vaccinated and without any risks for HBV, HBsAg and anti-HIV 1-2 neg. (Roche Diagnostics), anti-HCV/anti-TP neg. (Ortho Diagnostics), NAT neg. (Chiron Corporation), with normal serum ALT values, was transfused in 3 patients from different departments of the IRCCS Fondazione G. Pascale. None of them was, at the time of transfusion, HBsAg pos. or showed HBV risk factors. Only patient 1 (pz.1), plasma recipient, was affected by a severe immunosuppression for a non-Hodgkin's lymphoma.

When 7 months later, SV returned to our observation, not referring any new risk factors, he was NAT pos./HBsAg neg., with normal ALT values. The serological profile showed positivity for HBsAb (55 IU/ml), HbCAb, HBeAb and low HBV-DNA serum levels (57 IU/ml). A similar profile was observed in pz.1 with the presence of high HBV DNA levels (3,380 IU/ml) and abnormal ALT values. No symptoms and absence of HBsAg and HBV-DNA was observed in the other patients (2 and 3), transfused with platelets and red cells.

Molecular analysis showed in SV and pz.1 a genotype D and 5 mutations in the pre-S/S region: T116N, T123I, D144V, G145K, I150T, three of them never described.

Previous studies clearly show that mutations in the MHR region may induce reduced sensitivity to commercially available HBsAg tests with an increased rate of "false negative". Since all the 5 mutations were located within the MHR region, we concluded that SV was affected by an OBI at the time of the donation and the transmission of the infection to pz.1 could be favored by the immunosuppression state.

Conclusion: Our study shows how the risk of OBI infection new mutations-related is the new challenge of transfusion safety. Introduction of HbCAb as screening for donors and a national study for the identification of new mutations could be a new strategy for the transfusion safety.

P274

RELATIONSHIP BETWEEN PLATELET COUNTS AND K MEASURED ON BLOOD GAS ANALYSERS AND CENTRAL LABORATORY METHODS IN HOSPITAL WORKING FLOW

S. Rapi, B. Salvadori, M. Pellegrini, M. Pontieri, F. Veroni, A. Ognibene

Laboratorio Generale, Dipartimento Servizi, AOU Careggi, Firenze

Introduction: increase of potassium concentration in serum may be a consequence of pseudohyperkalemia caused by the haemolysis of red blood cells or the release of potassium from platelets in the test tube. A ward of our hospital noticed a significant difference between K levels measured by bloodgas analyzers (ABL 90, Radiance, Denmark) and the central laboratory results (Vista 1400, Siemens, USA) in not haemolysed samples of a patient with high levels of platelets (662.000) and asked us to investigate the problem. Previous verify of testing site neutrality did not show significant differences so we hypothesized an overestimation due to platelet activation by anticoagulant leading us to investigate the relation between K values and platelet count with our operative protocols.

Materials and Methods: Bloodgas analyzers perform determinations on lithium-heparin tubes while Vista instruments utilize gel-separator test tubes without anticoagulants. We verified instrument efficacy and systems alignment using control material and human samples. We test the differences on K values obtained with the two system on serum and plasma in a group of 6 patients with increased number of platelets (range 386.000-1155.000), haemolysis was verified in detail in samples included in the investigation. Relationship between K values reported by the two systems were investigated also recovering data on a single subject with a significant increase of platelet counts (150.000-572.000) during the recovery period.

Results: Analysis of the serum, plasma and control material performed did not show significant differences. Increasing differences in K concentrations measured in serum and plasma was observed with increasing platelet count. Increased difference in ABL to Vista ratio of K values (from 0 up to 6.5%) were observed during in the subject with increasing number of platelet.

Conclusions: K release from platelets is a well-known phenomenon, influence on K measurements must be considered by laboratory operators. Modifications of this parameter can be observed in patients with platelet counts little above normal range.

Mäkelä K, Kairisto V, Peltola O, et al. Effect of platelet count on serum and plasma potassium: evaluation using database information from two hospitals. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1995;222:95-100.

P275

DETERMINAZIONE DELLA EMOGLOBINA GLICATA CON STRUMENTAZIONE POCT: ESEMPIO DI APPLICAZIONE DELLA DD 29 MARZO 2010, N199 ALLEGATO A REGIONE PIEMONTE

V. Bianchi, F. Martino, S. Piccinini, A. Pinca, S. Premaschi, G. Sida, R. Guaschino

S.C. Laboratorio Analisi ASO Alessandria

Introduzione: Con la DD 199/10 la Regione Piemonte ha approvato l'allegato A "Modello operativo di riferimento per le attività analitiche eseguite con tecnologia POCT in ambito ospedaliero". Scopo di questo lavoro è valutare il sistema B Analyst (Menarini) sulla base di questa normativa.

Materiali e metodi: Sono stati misurati campioni con HbA1c tra 20-113 mmol/mol, con urea maggiore di 100 mg/dL, Biorad Lyphocheck Diabetes Control, liv 1 e 2, i risultati confrontati con quelli derivanti dallo strumento Sebia Capillary Flex 2, in uso nel Laboratorio.

Risultati Imprecisione: Calcolata per fasce di concentrazioni su 5 replicati. I risultati espressi come media (mmol/moli), DS e CV%. Campione A: 37.5;0.55;1.46; Campione B: 44.2;1.30;2.95. Campione C:55.0;0.71;1.28. Campione D: 65.2;1.92;2.95. Campione E: 112.0;3.0;2.67

Inaccuratezza Analizzati i materiali di controllo su 5 replicati. I risultati espressi come valore teorico del materiale di controllo, valore medio su Banalyst (mmol/moli) e differenza % tra i due.

Livello 1 :38,32, 15.13%, Livello 2: 113, 57.4, 50.7%.

Hb carbamidata: nessuna variazione significativa in presenza di urea superiore a 100 mg/dL. Varianti Hb Non è stata effettuata. Allineamento: Misurate le HbA1c di 31 campioni con lo strumento POCT, i risultati paragonati con quelli dello strumento di Laboratorio (L). Correlazione trovata $POCT=1.0254xL$, $R^2=0.9934$. Tracciabilità e tenuta sotto controllo Possibile solo con strumento interfacciato. Certificazioni: IFCC e NGSP. Costo: 8.0 (B Analyst) e 1.0 € (Capillary). Facilità d'uso: TAT elevato (10 min), 5% risultati non validi, posizionamento capillare delicato, condizionamento cartuccia fondamentale.

Conclusioni: Lo strumento BAnalyst risponde pienamente ai requisiti della DD del Piemonte. Le criticità maggiori sono costo e TAT. Si raccomanda, caso per caso, una attenta valutazione dei reali vantaggi che il Medico potrebbe avere dall'introduzione in Reparto di un POCT per il dosaggio della HbA1c.

P276

THE ROLE OF EQAS: EXPERIENCES AND THOUGHTS AFTER THE 2014 SIBIOC PILOT EQAS FOR HbA1c

A. Mosca

Dip. di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Centro per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi di Milano

Two fresh blood samples collected with EDTA were distributed by courier in December 2014 to 206 Italian laboratories asking for the determination of their HbA1c content. Target HbA1c values were assigned by the IFCC reference measurement procedure based on HPLC-capillary electrophoresis. The results, collected from 193 laboratories using kits from five different manufacturers (Bio-Rad Laboratories, A. Menarini Diagnostics, Roche Diagnostics, Sebia and Tosoh), showed a global variability of 5.3 % (in terms of CV, %) and of 3.8 % at an HbA1c value of 37.4 mmol/mol (sample 1) and 62.0 mmol/mol (sample 2), respectively. Inter-laboratory CVs, calculated per group of methods, were between 3.3 to 5.0 % and between 2.2 and 3.7 % for sample 1 and 2, respectively. Tosoh users registered the smaller inter-laboratory CV in sample 1, and Sebia's in sample 2. With regard to trueness, all methods had a mean bias of ≤ 2.0 % respect to the target values, with the exception of Menarini (bias of +2.5 % in sample 2) and of Tosoh (bias of +6.1 and +5.8 %, for samples 1 and 2, respectively). Globally, 84 % of the participants reported HbA1c results within the total allowable error of 8.6 % (sample 1) and 93 % for sample 2. These percentages decreased to 70 and 77 % respectively, when using a goal for the allowable total error (TE) of 6.0 % as criterion.

In conclusion, this pilot study has proven that it is possible to organize and execute an EQAS for HbA1c by using the native biological sample, thus avoiding any possible problem of matrix effect. Moreover, the comparison with the target values has clearly evidenced the bias problems of some methods, thus stimulating the manufacturers to further corrective actions. The performances of a significant number of participants have still to be improved, in order to reach the more stringent target of the total error equal to 6.0%. Finally, the possibility of repeating, on a regular base, this kind of VEQ is under investigation. In principle, such kind of VEQ could be extended also to other measurands.

P277

ARMONIZZAZIONE E STANDARDIZZAZIONE NELLA DIAGNOSTICA DELLE EMOGLOBINOPATIE ALLA NASCITA: TRAGUARDI POSSIBILIG. Barberio¹, G. Ivaldi²¹*U.O. Medicina di Laboratorio, Azienda ULSS n.9, Treviso*²*Lab. di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova*

Armonizzazione e Standardizzazione, argomenti molto dibattuti negli ultimi anni, sono processi da perseguire anche nella diagnostica delle emoglobinopatie alla nascita. Se nella fase pre-analitica e post-analitica, momenti in cui è più facile una confrontabilità e dunque una adesione a comportamenti univoci e quindi più facile l'armonizzazione dei processi, risulta invece più tortuosa tale applicazione nella fase analitica. E questo è dovuto non solo all'assenza della Hb A2 nel neonato e alla massiva presenza di Hb Fetale, ma soprattutto all'eventuale presenza di varianti emoglobiniche oggi sempre più frequenti e alla contemporanea presenza di difetti genetici non associati ai geni globinici, di fattori non genetici e quindi di variabili che condizionando le fasi della ematopoiesi complicano il raggiungimento di una conclusione genetica. Ciò nonostante si ritiene che una raccolta sistematica di informazioni pre-test, la conoscenza del quesito diagnostico, l'utilizzo di una terminologia aggiornata e condivisa, l'utilizzo di valori di riferimento confrontabili per le varie frazioni Hb e dunque un processo di armonizzazione che riguardi tutto il TTP (Total Testing Process) sia possibile e possa tradursi in un dato genetico conclusivo più corretto che favorirà comportamenti efficaci sia in termini di prevenzione che di conduzione terapeutica dei pazienti.

Le recenti raccomandazioni per la diagnostica delle emoglobinopatie alla nascita, prodotte con il contributo SIBioC, pur non approfondendo specificatamente questi concetti, forniscono dei criteri e spunti metodologici che vanno proprio nella direzione di una appropriatezza e di una armonizzazione dei comportamenti.

La crescente diffusione di esami per le emoglobinopatie alla nascita, la variabilità delle richieste e dei quesiti diagnostici renderanno necessario in futuro un maggior impegno per i laboratori proprio nella direzione di una standardizzazione e armonizzazione dei percorsi e questo potrà rappresentare una sfida anche per un impegno professionale nuovo di tutto il personale che a diversi livelli potrà essere coinvolto.

P278

PREVALENCE AND NUMBER OF CIRCULATING TUMOUR CELLS AND MICROEMBOLI AT DIAGNOSIS OF ADVANCED NON-SMALL-CELL LUNG CANCER (NSCLC)P. Pinzani¹, C. Maddau², M. Falchini³, F. Salvianti¹, M. Nistri³, E. Bertelli³, L. Sali³, S. Zuccherelli³, A. Vella⁴, M. Matucci², L. Voltolini⁵, A. Lopes-Pegna⁶, M. Luconi⁷, M. Mascalchi³, M. Pazzagli¹¹*Clinical and molecular Biochemistry Lab. Dept. SBSC, University of Florence*²*Oncological Prevention Laboratory, ISPO, Florence*³*Diagnostic and Interventional Radiology Units, Dept. SBSC, University of Florence*⁴*Nuclear Medicine Unit, Le Scotte University Hospital, Siena*⁵*Division of Thoracic Surgery, Careggi Hospital, Florence*⁶*Division of Pneumology, Careggi Hospital, Florence*⁷*Endocrinology Unit, Dept. SBSC, University of Florence*

Background: Circulating Tumor Cells (CTCs) represent a "liquid biopsy of the tumor" which might allow real-time monitoring of cancer biology and therapies in individual patients. CTCs are extremely rare in the bloodstream and their analysis is technically challenging.

Our aim is to determine the presence and the number of CTC and circulating tumor microemboli (CTM) in patient affected by advanced lung cancer.

Methods: Twenty-eight consecutive patients with suspected stage III-IV lung cancer gave consent to provide 15 mL of peripheral blood soon before diagnostic CT-guided fine needle aspiration biopsy (FNAB). CTC and CTM (clusters of >3 CTC) were isolated by cell-size filtration (ScreenCell), identified and counted by cytopathologists using validated morphometric criteria and (in 6 cases) immunostained for vimentin.

Results: Fine needle aspirate biopsy (FNAB) demonstrated non-small-cell lung cancer (NSCLC) in 26 cases. At least one CTC/3 mL blood (mean 6.8+3.7) was detected in 17(65%) and at least one CTM (mean 4.5+3.3) in 15(58%) of the 26 NSCLC cases. No correlation between number of CTC or CTM and tumor type or stage was observed. Neoplastic cells from both FNAB and CTC/CTM were positive for vimentin but heterogeneously.

Conclusions: We demonstrated the ability of a filtration-based method to capture and cytologically identify CTCs and CTMs in lung cancer in a blood sample taken at the time of FNAB. This represents a first step towards the introduction of the liquid biopsy in the clinical management of lung cancer patients with the aim of complement or avoid the FNAB.

P279

TOSOH 1-84 INTACT PTH ASSAY EVALUATION IN AN INTEGRATED HIGH AUTOMATION PLATFORM

S. Valverde¹, F. Antico¹, M.M. Salvadego¹, F. Gessoni¹, V. Lidestri², M. Urso², G. Gessoni¹

¹*Clinical Pathology Dept., Chioggia Hospital*

²*Nephrology and Hemodialysis Unit, Chioggia Hospital*

Background: Parathyroid hormone (PTH) secretion from parathyroid cells is regulated by action of the calcium on calcium-sensing receptor. Vitamin D metabolites and phosphorus have chronic indirect effect on PTH secretion via effects on PTH gene transcription or PTH mRNA stability. Measurements of the serum levels of PTH hormone allows for diagnosis and monitoring of several metabolic bone disorders. In last half century many assays for the measurements of PTH levels in the serum or plasma have been developed. It is important to understand characteristics of these assays to be able to make informed diagnostic conclusions from their results. The TOSOH AIA-PACK allow quantification of intact (1-84) PTH. The aim of that work was to evaluate the analytical performance of this new test.

Materials and Methods: By using two different TOSOH AIA 2000 analyzers connected with a Thermo EnGen automation, we evaluated the following analytical characteristics: within run and inter assays precision (CLSI EP-5A2), analytical and the functional sensitivity (CLSI EP-17), linearity (CLSI EP-6A), recovery (CLSI EP-6P).

Results: Within run and inter assays precision did not exceeded 7% . Analytical and functional sensitivity were respectively 0.9 and 2.5 pg/mL. The mean recovery was 92.0%. The method was found to be linear until the 1/10 dilution. We observed a very good correlation of this assays with the method previously adopted in our Laboratory.

Conclusions: In this paper we evaluated the analytical performance of a 1-84 intact PTH assay supplied by TOSOH, this evaluation was performed by using two AIA 2000 analyzers connected, within a high automation core-lab area. In these conditions TOSOH AIA PACK Intact PTH demonstrated a series of remarkable analytical performances with an accuracy profile showing that the method is completely validated between 7 and 1050 pg/mL. We also observed, in a group of hemodialysis patients a very good correlation with our previous method.

P280

TOSOH 25-OH VITAMIN D ASSAY IN AN INTEGRATED HIGH AUTOMATION PLATFORM

S. Valverde, F. Gessoni, F. Antico, M.M. Salvadego, L. Penzo, G. Gessoni

Clinical Pathology Dept., Chioggia Hospital

Background: A marked increase in laboratory testing for 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) has been fueled by an increased focus on the diagnosis and treatment of osteoporosis, the demonstration of a high prevalence of vitamin D deficiency in many populations, and the discovery that the biological significance of vitamin D extends far beyond its classic roles in the regulation of bone and mineral metabolism.

Materials and Methods: The TOSOH AIA 25-OH Vitamin D assay is an one step competitive immune assay, we evaluated this assay on two TOSOH AIA 2000 analyzers connected with a Thermo EnGen automation. In this study we evaluated the following analytical characteristics using CLSI evaluation protocols for testing precision (EP5), accuracy (EP15), linearity (EP6), as well as protocols for evaluating quantitative and qualitative methods (EP10, EP12), for estimating bias (EP9), and estimating total analytical error (EP21). The method comparison study was performed versus the assay previously adopted in our Laboratory (DiaSorin Liaison 25-OH Vitamin D).

Results: Infra and inter assays precision did not exceeded 8%. Linearity from 10 to 225 ng/mL was satisfactory. We observed a satisfactory correlation of this assays with the method previously adopted in our Laboratory.

Conclusions: Vitamin D testing continues to be a challenge for the clinical laboratory, which is expected to provide reliable results in a timely manner for this high volume assay. Vitamin D is not an easy analyte to measure. Some key issues for immuno assays include lot-to-lot variation, human anti-animal antibody interferences, interferences from other hydroxylated vitamin D metabolites, and the ability to separate 25-OH-D from its binding protein. In this study, the TOSOH AIA 25-OH Vitamin D assay demonstrated good linearity (0.99) and imprecision, both within run (CV<6.5%) than inter runs (CV<8%). Moreover this assay, in our Laboratory, has been implemented, without any difficulty, in a high automation Core-Lab area.

P281

VALUTAZIONE DELL'ORMONE ANTI-MULLERIANO

T. Lamacchia, R.M. Russo, A. Longhi, S. Brenna, S. Granata

Lab Analisi chimico cliniche e microbiologia, S.S. di Biochimica Clinica, A.O. Niguarda Ca' Granda, Milano

Background: L'ormone anti-mulleriano è prodotto nell'ovaio dalle cellule della granulosa. Regola la crescita e lo sviluppo dei follicoli nelle fasi da follicoli primari a piccoli antrali ($\geq 4-6$ mm). Il crescente interesse per l'ormone anti-mulleriano nasce dalle peculiari caratteristiche nel campo della endocrinologia ginecologica, è sempre più determinato nelle tecniche di fecondazione assistita e negli ultimi anni utilizzato in modo sempre più incisivo per valutare i danni all'ovaio provocati da

interventi chirurgici e/o chemioterapici.

Obiettivo-Metodo: Valutare la misura della concentrazione dell'ormone nel siero con una nuova metodica automatizzata (ECLIA, Cobas 8000 Roche), confrontandolo con metodo ELISA sia della Beckman Coulter (BC) sia della Technogenetics (DSX). Sono stati utilizzati campioni di siero. Sono stati valutati l'imprecisione, il CQ (controllo qualità) ed il confronto tra le diverse metodiche (comparazione tramite Passing-Bablok).

Risultati: I campioni provengono da 80 pazienti di sesso femminile di età compresa tra i 35 e 45 anni, sottoposte a tecniche di fecondazione assistita. Imprecisione Cobas 8.000 su N° 21 replicati soggetto F sano: Media=4.83 ng/mL, DS=0.024 con imprecisione nella serie CV=0.51%. QC (controlli Precicontrol low/high) N=20, Low: Media=0.97 ng/mL, DS=0.019, CV=2.02%; High: Media=5.26 ng/mL, DS=0.126, CV=2.41%. Passing-Bablok DSX-Cobas N=80 Slope: 0.867 [0.798; 0.982], Intercept: -0.038 [-0.098; 0.001], R=0.98. Passing-Bablok BC- Cobas Slope: 0.727 [0.677; 0.810], Intercept -0.05 [-0.08; 0.03], R=0.98.

Conclusioni: L'introduzione di nuovi metodi in automazione rende molto più affidabile la fase preanalitica, analitica e post-analitica: completa automazione, unica provetta, conservazione, tempi di esecuzione, ottima precisione, ottimizzazione dei tempi di refertazione.

Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for anti-Mullerian Hormone. Clin Chem Lab Med 2014;52:1143-52.

P282

FIRST COMPARISON BETWEEN THE ANALYZERS MINDRAY BC-6800 AND SYSMEX XN FOR A QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DIFFERENTIAL COUNTS

T. Mecca, M. Seghezzi, A. La Gioia, L. Cerutti, A. Crippa, M. Vavassori, S. Buoro

USC SMeL Generale di Base, Laboratory of Clinical Chemistry, A.O. Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

Background: New generation hematology analyzers offer excellent performances and fast, economic and accurate assessment of blood samples. Since every instrument is characterized by different technologies, a direct comparison between the performances of various types of analyzers can be sometimes difficult. The aim of our study is to evaluate the comparison between both Sysmex XN (XN), with App PLT and WPC, and Mindray BC-6800 (BC-6800) instruments. We evaluated the correlation between data from blood cell counts, morphological differentiation and instrumental flags morphology on either.

Materials and Methods: Nine hundred and nine blood samples, collected in K₃EDTA tubes, were tested on both BC-6800 and XN. Pearson's correlation was evaluated to compare the absolute leukocytes (WBC) and differential count, according to the Guideline of the International Council for Standardization in Haematology (ICSH) (1). Morphological flags for WBC, red blood cells (RBC) and platelets (PLT) were compared through Chi-squared test. The statistical analysis was carried out with Analyse-it Software for Microsoft Excel (Analyse-it™ Ltd, Leeds, UK).

Results: The agreement between BC-6800 and XN for WBC count shows a Pearson's correlation $r=0.99$; for Neutrophils $r=0.98$; for Lymphocytes $r=0.99$; for Monocytes $r=0.88$ and for Eosinophils $r=0.97$ with all $p < 0.0001$. The correlation for erythroblasts (NRBC), Immature Granulocytes (IG), RBC and PLT counts show the same Pearson's coefficient $r=0.99$ for all of them ($p < 0.0001$). Similarly, Chi-squared test exhibits a good agreement for WBC Abnormal Scattergram, NRBC Present, IG present, AbnLympho/Blast, Blast, Anemia and PLT Clumps flags with all $p < 0.0001$.

Conclusions: The results suggest a significant agreement between BC-6800 and XN for morphological flag analysis ($p < 0.0001$) and even for the other assessed parameters. In conclusion, our preliminary evaluation entails an implicit demonstration of the good comparison between the instruments, even if partial and limited to the examined parameters.

1. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analyzers including those used for differential leukocyte and reticulocyte counting, 2014.

P283

ANALYSIS OF BODY FLUIDS SAMPLES USING THE AUTOMATED HAEMATOLOGY ANALYZER XN1000: COMPARISON WITH AUTOMATED DIGITAL MICROSCOPY, MANUAL TC AND WBC COUNTS

M. Lorubbio, T. Rondelli, A.M.G. Gelli, R. Caporale, F. Angiolini, R. Barbuti, F. Martone, M. Tonelli, G. Cesaro, C. Gattini, F. Daniele, A. Fanelli, B. Peruzzi

Laboratorio Generale, AOU-Careggi

Aim: Analysis of body fluid (BF) samples provides useful information in the diagnosis of some clinical disorders. The introduction of BF modules on modern hematology analyzers can optimize BF analysis by reducing these limitations for most BF samples. In this study we evaluated the performance of the BF module (BFM) of the Sysmex XN1000 in counting Total Nucleated Cells (TC), WBCs and WBC differential (PMN, polymorphonuclear; MN, Mononuclear cells) in ascites (AF) and pleural (PLF) fluids. Results were compared with manual TC and WBC counts performed in a Nageotte counting chamber (MC) and WBC differential, performed by expert operators with the automated digital microscopy CellaVision DM96.

Methods: 85 BF samples (35 AF and 55 PLF) were evaluated. Cytospin slides were prepared and stained. Statistical analysis was performed by Pearson correlation (r value) and Passing Bablok regression analysis. Carry-over, linearity, precision profile for TC, WBC, MN and PMC counting were also evaluated on the Sysmex XN according to ICSH and CLSI standard documents

Results: Negligible carry-over (<0.4%) and excellent precision were found. At lower cell concentrations (5 TC $\times 10^6/L$, 5 WBC $\times 10^6/L$, 4 MN $\times 10^6/L$; 38 PMN $\times 10^6/L$) CV values were always <17%. Excellent linearity ($r=1.0$) with no deviation from expected values were found in the range of 0-654 TC $\times 10^6/L$, 0-640 WBC $\times 10^6/L$, 0-555 MN $\times 10^6/L$, 1-87 PMN $\times 10^6/L$. Comparison on patient samples showed good agreement between methods: $y=1.08+19.6$, $r=0.98$ for TC; $y=1.05+13.9$, $r=0.98$ for WBC; $y=1.03+10.5$, $r=0.96$ for PMN; $y=1.04+12.9$, $r=0.96$ for MN. A slight statistically overestimation of XN counting were observed for TC (95% CI of slope 1,02 to 1,14) and for WBC (1.01 to 1.11)

Conclusions: Our results show that BFM of the XN1000 is a suitable tool for fast and accurate quantification of TC, WBC, MN and PMN in BFs in a diagnostic setting, replacing manual microscopy in the majority of samples. Samples showing abnormal pattern distributions of flagged by the analyzer and malignant fluids should be evaluated manually.

Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, et al. Validation of the BFM on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin Chem Lab Med 2012;50:1791-8. doi: 10.1515/cclm-2011-0927.