biochimica clinica

BC pubblica lavori concernenti, in senso lato, la *biochimica clinica* e la *biologia molecolare clinica*. Di norma si accettano lavori scritti in *lingua italiana*. Gli Autori che desiderano pubblicare in altra lingua (*francese o inglese*) devono avere una ottima conoscenza del rispettivo linguaggio scientifico. A richiesta degli Autori od a giudizio della Redazione i lavori sono pubblicati nelle differenti Sezioni e Rubriche via via attive. Le presenti norme devono essere obbligatoriamente osservate per i lavori destinati alla sezione "contributi scientifici": si consiglia in ogni modo di seguirle anche per pubblicazioni in altre Sezioni, quando applicabili.

PREPARAZIONE DEL MANOSCRITTO

I lavori, con particolare riferimento a quelli sperimentali, devono comprendere nell'ordine le seguenti parti e capitoli.
Titolo: conciso ma esplicativo dei contenuti (non deve includere sigle o abbreviazioni).
Autore (i), **nome e cognome per esteso**, e loro affiliazione corretta.
Indirizzo postale (completo di numero di telefono, fax, indirizzo E-mail) dell'Autore corrispondente.
Abstract (riassunto in inglese, circa 120 parole), preceduto dal titolo anch'esso in inglese. In caso di difficoltà, si può richiedere la traduzione dall'italiano in inglese a cura della Redazione.
Riassunto: in italiano, succinto (circa 120 parole), ma informativo.
Introduzione: breve descrizione dello scenario in cui il lavoro (la ricerca) si colloca con riferimenti alla letteratura rilevante, seguita da indicazione dello scopo del lavoro.
Materiali e metodi: descrivere nell'ordine casistiche cliniche o di popolazione; reagenti chimici e biologici, kits; calibratori, materiali di controllo; strumenti e sistemi analitici; metodi analitici; metodi statistici. In relazione ai contenuti di ciascun lavoro, si darà maggiore dettaglio al(ai) sottocapitolo(i) di maggiore rilievo. Nel caso di utilizzo di reagenti e sistemi commerciali comuni, è sufficiente indicare il principio del metodo ed il sistema analitico impiegato.
Risultati: riportati sinteticamente, con una sequenza logica riflettente lo scopo del lavoro, con puntuali riferimenti alla iconografia allegata (tabelle e figure).
Discussione: significato dei risultati conseguiti in relazione allo scopo del lavoro, ad ipotesi riportate in letteratura, ad ipotesi emesse, ad eventuali concordanze o discordanze con osservazioni precedenti, spunti di interpretazione clinica e/o analitica dei risultati. Breve conclusione con accenno al raggiungimento, o meno, dello scopo.
Le varie parti (confronta: G. Ceriotti. Qualche consiglio su come scrivere un articolo scientifico. Giorn It Chim Clin 1991;16:137-142) devono essere scritte in stile succinto ma non telegrafico, curando il linguaggio italiano ed evitando le espressioni in gergo od eccessivamente familiari, i vocaboli stranieri, quando non indispensabili, nonché i vari tentativi di italianizzarli. Le abbreviazioni, escluso alcune di uso codificato e non-ambigue (per es. DNA; NAD; ALT/AST), devono essere riportate tra parentesi, dopo l'espressione per esteso, la prima volta che ciascuna di esse compare. Per esempio "… l'emoglobina (Hb) è stata misurata …" . Le unità di misura devono essere corrette e razionali (vedi G De Angelis, C Franzini. Giorn It Chim Clin 1990;15:1-50). Per le unità di concentrazione (di massa, di sostanza, di attività, di numero), nel testo e nella iconografia, usare il litro ("L") al denominatore. I valori numerici vanno riportati con il numero di cifre significative consistenti con la variabilità intrinseca delle misure; le cifre decimali devono essere staccate con la virgola (testo, tabelle e figure!).

FIGURE E TABELLE

I risultati possono essere riportati in tabelle (quando è di prevalente importanza il dettaglio del numero, o quando si tratta di osservazioni/descrizioni) oppure in figure (quando è di maggiore rilievo la valutazione rapida e di insieme, o quando non è possibile altrimenti). Per il medesimo gruppo di dati utilizzare l'una o l'altra forma, *non entrambe.*

Le tabelle devono essere ordinate in righe e colonne; ciascuna colonna deve avere una chiara intestazione, includente il minimo di abbreviazioni, le unità in cui sono espressi i valori numerici, anche se specificate nella didascalia. Ciascuna tabella deve essere scritta su un singolo foglio bianco: sul foglio deve essere riportata, in testa alla tabella, la relativa didascalia preceduta dal numero di tabella. Le tabelle deveno essere numerate consecutivamente in cifre arabe, a partire da 1, nell'ordine di citazione nel testo.
Le figure devono essere in bianco e nero, di qualità grafica tale da consentirne la diretta riproduzione, tenendo conto della inevitabile riduzione. Le fotografie anche se inviate a colori (eventualmente come diapositive) verranno riprodotte in bianco e nero, e devono quindi essere di ottima qualità. Nel caso di grafici di vario genere si ponga attenzione ad una corretta rappresentazione ad alla corretta espansione degli assi. E' raccomandata la composizione computerizzata, con il programma di grafica MS Power Point. I grafici devono essere stampati in bianco e nero con stampante laser su carta di alta qualità per stampe laser (per esempio Laser Copy Pigna, 110 g/m^2). Le figure devono essere numerate consecutivamente in cifre arabe a partire da 1 secondo l'ordine di citazione nel testo. Il numero della figura, preceduto dal cognome del primo autore, (per esempio, "*G. Verdi, figura 1*") deve essere riportato a lapis, con tratto leggero, al margine di ciascuna figura. Ciascuna figura deve essre corredata da una didascalia: tutte le didascalie, precedute dal numero della figura, devone essre riporate in ordine su un unico foglio.

BIBLIOGRAFIA

Le voci bibliografiche devono essere numerate progressivamente secondo l'ordine di citazione nel testo, a cominciare da 1. Il numero di sequenza deve comparire nel testo (tra parentesi) ove appropriato. Le singole voci devono essere riportate secondo lo stile (Vancouver) esemplicate qui sotto, facendo attenzione ad una corretta punteggiatura.
1. Soper CPR, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic insulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:497-501.
2. Barrati J, Ettalbi M. Thermostable insulinases from A. ficcum. In: Fusch A, editor. Insulin and insulin-containing crops. London Elsevier Science Publisher 1993;211-6.
3. Constantin E, Schnell A. Mass spectrometry. Chichester: Ellis Horwood Limited 1991;155-72.
Riportare tutti i nomi degli Autori di ciascun lavoro fino ad un massimo di cinque. Se maggiore di cinque, riportare i primi cinque, seguiti da "et al."

INVIO DEL MANOSCRITTO

Si raccomanda la scrittura con uno dei correnti programmi di videoscrittura (per esempio MS Word). Stampare con stampante di buona qualità (laser o getto di inchiostro) su un solo lato di fogli bianchi A4, a doppia interlinea e con margine di 3 cm a destra e sinistra. Numerare le pagine, nell'ordine: pagina con il titolo e gli autori; pagine del testo (nell'ordine su menzionato); bibliografia; tabelle; didascalie delle figure.
Inviare 1 copia del manoscritto (completo di figure e tabelle), e contemporaneamente il medesimo come *file* su dischetto (da 3,5") o come allegato di e-mail. Inviare file separati per testo e tabelle (possibilimente MS Word) e per i grafici e figure disegnate al computer (possibilmente MS Power Point). Nella preparazione del testo evitare al massimo i comandi di formattazione e l'utilizzo di caratteri differenti. Il tipo di carattere per le varie parti (titoli, eccetera) sarà scelto in sede di composizione redazionale.

Inviare a: REDAZIONE DI BIOCHIMICA CLNICA
Sig.na Manuela Pangrazio presso BIOMEDIA srl, Via C. Farini 81, 20159 MILANO
Tel. 02/69001316 int. 216; Fax: 02/69001311
www.biomedia.net editoria@biomedia.net

LETTERA DI ACCOMPAGNAMENTO

Ciascun lavoro deve esere accompagnato da una lettera a firma dell' Autore corrispondente, nella quale viene indicato:
- che il testo ha ricevuto l'approvazione di tutti gli Autori e del Direttore dell'Istituto, Dipartimento, Laboratorio o altro di provenienza;
- il nome dell'Autore corrispondente, con l'indirizzo completo di telefono, fax ed indirizzo e-mail.

BC si riserva di accettare o meno i lavori inviati oppure di richiederne opportune revisioni agli Autori, eventualmente dopo consultazione di revisori esterni. Modifiche di stile o di linguaggio nel testo o nella iconografia possono essere introdotte dalla Redazione. In linea di massima non è previsto l'invio di bozze di stampa agli Autori.

SIBioC 2004

36° Congresso Nazionale

Società Italiana Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

Contributo del laboratorio al miglioramento continuo dei risultati in medicina

8-11 Giugno 2004
Fiera di Padova

PRESIDENTE DEL CONGRESSO

M. Plebani (Padova)

COMITATO SCIENTIFICO

G. Baggio (Padova), P.A. Bonini (Milano), P. Bonvicini (Padova), C. Cascone (Padova), A. Catapano (Milano), F. Ceriotti (Milano), A. Cremaschi (Treviglio, BG), L. Deiana (Sassari), B. Dente (Napoli), G. Federici (Roma), G. Federspil (Padova), C. Franzini (Milano), G. Guidi (Verona), G. Manganaro (Mestre, VE), S. Mengozzi (Cesena), G. Messeri (Firenze)G. Nubile (Chieti), F. Salvatore (Napoli), A. Tiengo (Padova), M. Tocchini (Ancona), G. Trucco (Chivasso, TO), D. Uccelletti (La Spezia), E. Zepponi (Rieti), G. Zucchelli (Pisa)

SEGRETERIA SCIENTIFICA

E. Ascari (Brescia), F. Ceriotti (Milano), C. Dotti (Reggio Emilia), G. Guidi (Verona), L. Leone (Torino), M. Panteghini (Brescia), M. Pazzagli (Firenze)

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

EMMEZETA CONGRESSI
Via C. Farini, 81-20159 Milano, tel. 02/66802323 (r.a.) - fax 02/6686699 - e-mail sibioc2004@mzcongressi.com

SIBioC 2004

36° Congresso Nazionale
Società Italiana Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

CORSO PRECONGRESSUALE

IL LABORATORIO DI COAGULAZIONE: ASPETTI DIAGNOSTICI ED ORGANIZZATIVI LA DIAGNOSI DELLE MALATTIE EMORRAGICHE

Padova, 8 giugno 2004
Hotel Sheraton di Padova

PROGRAMMA

I SESSIONE

Moderatori:	A. Buggiani (Empoli, FI), B. Morelli (Legnano, MI)
9.15	Fisiologia dell'emostasi P. Simioni (Padova)
9.45	Approccio al paziente emorragico: anamnesi ed esame obiettivo P. Tagariello (Castelfranco V.to - TV)
10.15	Approccio al paziente emorragico: diagnosi di laboratorio R. Bader (Milano)
10.45	Il laboratorio nelle urgenze emorragiche P. Carraio (Padova)
11.15	Intervallo

II SESSIONE

Moderatori:	M. Plebani (Padova), E. Ascari (Brescia)
11.30	Le emofilie E. Santagostino (Milano)
12.00	La malattia di Willebrand A. Federici (Milano)
12.30	Il contributo della biologia molecolare nella diagnosi delle malattie emorragiche F. Bernardi (Ferrara)
13.00	Intervallo

III SESSIONE

Moderatori:	A. Pagnan (Padova), E. Rossi (Milano)
14.00	Disordini emorragici in ostetricia E. Rossi (Milano)
14.30	La DIC S. Testa (Cremona)
15.00	La porpora trombotica trombocitopenica P. M. Mannucci (Milano)
15.30	Alterazioni dell'emostasi nelle malattie mieloproliferative croniche M. Luoni (Legnano)

IV SESSIONE

Moderatori:	B. Morelli (Legnano), E. Ascari (Brescia)
16.00 - 17.00	Discussione Interattiva

SEDE

Hotel Sheraton di Padova
Corso Argentina 5 - 35129 Padova

QUOTE DI ISCRIZIONE

Socio SIBioC Laureato*	65,00 euro più Iva = 78,00 euro
Socio SIBioC Tecnico*	45,00 euro più Iva = 54,00 euro
Non socio Laureato	130,00 euro più Iva = 156,00 euro
Non socio Tecnico	70,00 euro più Iva = 84,00 euro

* in regola con il pagamento della quota associativa 2004

La quota comprende: frequenza al corso, materiale didattico, attestato ECM, coffee break e colazione di lavoro.

CREDITI ECM

Sono stati richiesti i crediti ECM per le seguenti categorie:
Medico, Biologo, Chimico (Discipline accreditate: Biochimica Clinica, Patologia Clinica) e Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico.
I crediti sono attualmente in fase di valutazione.
Per avere diritto ai crediti è obbligatorio frequentare il 100% del totale delle ore di formazione.

ATTESTATO

Ai partecipanti sarà rilasciato un attestato di partecipazione valido per l'inserimento nel curriculum formativo.

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

BIOMEDIA S.r.l. - Sig.ra Serena Nicosia
Via C. Farini 81 - 20159 Milano Tel. 0269001316 int. 203 - Fax 0269001311
email: serena.nicosia@biomedia.net – sito: www.biomedia.net

Martedì 8 giugno

SIMPOSIO SATELLITE AMCLI e SIBioC

DAL COMPUTER CENTRALE IN LABORATORIO AI SISTEMI INFORMATICI INTEGRATI

Sala Carrarresi, 8.30-17.00

Moderatori: M. Plebani, C. Saccavini (Padova)

8.30 Inizio lavori

Le codifiche delle prestazioni di laboratorio

8.40 I sistemi di Codifica delle prestazioni
A. Rossi Mori (Roma)

9.00 Unificare le Codifiche: gioco virtuale o primo approccio per l'integrazione?
P. Mocarelli (Desio, MI)

Il referto strutturato

09:20 Il referto strutturato ed il CDA
G. Mercurio (Bari)

09:40 Prime esperienze di applicazioni del referto strutturato
P. De Nardi (Padova)

10:00 Coffee break

IHE

10:30 Approccio e metodologie IHE
P. Agonigi (Livorno)

10:50 Il workflow delle richieste di prestazioni di laboratorio
M. Mussap (Padova)

11:10 L'evoluzione dei nuovi profili di integrazione
P. Ghedini (Modena)

11:30 La visione "longitudinale " di IHE
C. Saccavini (Padova)

La firma digitale

11:50 Fondamenti tecnici e applicativi
W. Bergamaschi (Roma)

12:10 I problemi medico-legali
L. Di Grazia (Milano)

12:30 L'esperienza del progetto ESCAPE
R. Rigoli (Treviso)

12.50 Discussione

13.15 Lunch

14:30 Parte partica presso la Demo IHE

17:00 Fine lavori

MODALITA' DI PARTECIPAZIONE

La partecipazione al Simposio è libera e gratuita. Per poter partecipare è necessario registrarsi in anticipo tramite la scheda di adesione che trovate sul sito www.mzcongressi.com/medlab, da inviare via fax alla Segreteria Organizzativa **entro il 15 maggio 2004**.

Martedì 8 giugno

CERIMONIA INAUGURALE

ore 17.30-19.30, Sala C

INAUGURAZIONE DEI CONGRESSI SIBioC e AMCLI

- Saluto dei Presidenti dei Congressi

  AMCLI 2004 - G. Palù (Padova)

  SIBioC 2004 - M. Plebani (Padova)

- Saluto del Presidente AMCLI
  E.M. Magliano (Milano)

- Saluto del Presidente SIBioC
  L. Deiana (Sassari)

- Saluto del Prof. Giovanni Ceriotti (Padova)

- Benvenuto delle Autorità Locali

- LETTURA INAUGURALE
  La Filosofia della Scienza
  V. Milanesi (Padova)

- E' stato invitato il Ministro della Salute
  G. Sirchia

- *Cocktail di Benvenuto*

Mercoledì 9 giugno

ore 9.00-10.00, Sala C

LETTURA PLENARIA 1

Presentazione: T. Trenti (Pavullo nel Frignano, MO)

- The potential for bias and the need for clear reporting in studies of diagnostic accuracy
  P. M.M. Bossuyt (Amsterdam, the Netherlands)

ore 10.15-12.45, Sala C

SESSIONE 1

Evidence Based Laboratory Medicine
La medicina di Laboratorio basata sulle prove di efficacia

Moderatori: T. Trenti (Pavullo nel Frignano, MO)
G. Federspil (Padova)

- EBLM: The application of EBM to Laboratory Medicine
  P. E. Jorgensen (Odense, Danimarca)
- The Systematic Reviews in Laboratory Medicine
  A. Liberati (Milano)
- Trasferire i principi della Evidence Based Laboratory Medicine alla pratica quotidiana. Quali strategie e strumenti utilizzare
  T. Trenti (Pavullo nel Frignano, MO)

Comunicazioni selezionate:

- Accuratezza diagnostica dei saggi immunometrici per BNP e NT-proBNP
  A. Clerico (Pisa)
- Qualità... In cielo**:** indicatori e gestione degli eventi indesiderati. Dodici laboratori ci stanno provando.
  L. Vascotto (Cesena)
- Taking the clinical laboratory scientist off the endangered species list
  G. Giocoli (Milano)

è previsto il servizio di traduzione simultanea

ore 10.15-12.45, Sala E

SESSIONE 2

Analisi urgenti: quali, quando, come, dove?
Il "punto" sul POC(T)

Moderatori: M. Plebani (Padova), F. Tosato (Padova)

- L'informazione di laboratorio in urgenza: fra consolidamento e POCT
  M. Plebani (Padova)
- Point-of-care testing: currenti issue and future directions
  K. Lewandrowski (Boston, MA)
- Il progetto di diagnostica POCT nelle isole minori
  A. Scirè (Lipari, Messina)

Comunicazioni selezionate:

- Centrally-managed POCT: the Careggi experience
  M. Tronchin (Firenze)
- Management of emergency tests on a point of care network in hospitals with totally outsourced laboratory
  A. Dolci, M. Barberis (Milano)

Sessione Sponsorizzata da A.MENARINI diagnostics *Valori sostenibili, nel tempo.*

ore 10.15-12.45, Sala G

SESSIONE 3 - sessione internazionale
e-health trends and challenges

Moderatore: P.A. Bonini (Milano)

- Personalized services in e-health. The knowledge management challenge
  P.A. Bonini (Milano), A. Sanna (Milano)
- Privacy and cybersecurity in a connected world
  M. Wilkens (Ispra,VA)
- EPC - Eletronic Product Code and the biomedical industry
  R. Koh (Cambridge, MA)

è previsto il servizio di traduzione simultanea

Mercoledì 9 giugno

ore 13.15-14.15

A COLAZIONE CON L'ESPERTO

■ **Diagnostica delle componenti monoclonali**
G. Merlini
Laboratori di Biotecnologie, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Significato clinico di una componente monoclonale; approccio razionale allo studio del soggetto con componente monoclonale: presentazione e discussione delle linee guida nazionali e internazionali; discussione critica dei metodi di studio (linee guida SIBioC/IFCC sulla proteina di Bence Jones)

■ **Diagnostica delle allergie alimentari**
F. Borghesan
Servizio di allergologia del dipartimento di Medicina di Laboratorio, Padova

La diagnostica delle allergie alimentari rappresenta tuttora una grande sfida per l'allergologia clinica e di laboratorio. La diagnosi viene formulata innanzitutto in base alla storia clinica ma, non sempre questa è attendibile e sufficiente. Il test cutaneo mostra dei limiti. Quello in vitro va valutato con attenzione...

■ **Reti ospedaliere e riorganizzazione dei laboratori clinici**
S. Cencetti
Direttore di Presidio Ospedaliero Provinciale, Modena

Assetto organizzativo e flussi di lavoro tra l'unità centrale e i reparti ospedalieri e gli altri ospedali della provincia di Modena, comprensivo della integrazione con il POCT.

■ **Il laboratorio delle proteine nell'era del consolidamento**
M. S. Graziani
Laboratorio di Analisi chimico-cliniche ed ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Az.Osp. Verona

Verranno discussi i vantaggi e gli svantaggi di procedere al consolidamento della diagnostica proteica all'interno del laboratorio di chimica clinica. Verranno esaminati gli aspetti di carattere organizzativo, economico nonché le implicazioni relative alla diagnostica di laboratorio in questo campo.

■ **Diagnostica e monitoraggio del paziente diabetico**
A. Mosca
Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Universita' degli Studi di Milano

L'esperto sara' lieto di rispondere su tutti gli argomenti attuali di rilievo nel trattamento di laboratorio dei pazienti affetti da diabete mellito, con particolare attenzione a: linee guida, standardizzazione, nuovi test di laboratorio

■ **Il referto in ematologia**
M. Buttarello
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Az.Osp. Padova

Parametri obbligatori e facoltativi dell'esame emocromocitometrico e della leucocitometria differenziale; parametri in discussione ; i commenti e la terminologia.

■ **Diagnostica delle malattie metaboliche ereditarie**
A. Burlina
U.O. Malattie Metaboliche Ereditarie, Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedale - Università di Padova

La diagnosi delle malattie metaboliche ereditarie rappresenta un settore in continua espansione nell'ambito di un moderno laboratorio di biochimica clinica.
Verranno discusse le applicazione di nuove tecnologie quali la tandem MS-MS, l'elettroforesi capilare, la cromatografia liquida ad alta pressione con detector elettrochimico nella diagnosi di difetti del metabolismo ma anche il loro utilizzo nella diagnostica delle patologie acquisite.

■ **Marcatori proteici delle nefropatie**
M. Mussap
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Az.Osp. Padova

Le recenti linee-guida sulla diagnostica e sul monitoraggio dell'insufficienza renale e, più in generale, delle malattie renali, hanno evidenziato l'importanza del laboratorio clinico nell'approccio al paziente nefropatico. L'introduzione di alcune proteine plasmatiche ed urinarie consente una maggiore accuratezza diagnostica rispetto all'uso di test biochimici convenzionali come la creatinina, soprattutto in casi particolari, come il paziente con trapianto di rene, l'esordio del diabete mellito di tipo II e l'età neonatale e pediatrica.

■ **Dislipidemie: dalle determinazioni alle indicazioni terapeutiche**
A. Catapano
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano

Nel corso degli ultimi anni sta emergendo un ruolo sempre più importante delle apolipoproterine nel determinare il rischio cardiovascolare.Saranno argomenti di discussione le determinazioni di apolipoproteina B, APO A1, APO A2 e APO C, nonché il dosaggio del colesterolo non HDL quale metodo per ovviare i problemi correlati alla determinazione diretta e /o indiretta di LDL.

■ **Attualità nell'esame delle urine**
C. Ottomano
Dipartimento di Medicina di Laboratorio
A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo

L'esame urine completo rappresenta uno strumento importante per lo screening di malattie renali e sistemiche, purché si razionalizzi la fase pre analitica e si utilizzino in modo moderno vecchi e nuovi metodi analitici. La striscia reattiva è ancora attuale? I parametri che essa consente di misurare servono tutti veramente sempre? Il sedimento urinario va eseguito su tutti i campioni? Il referto è sempre efficace e "trasferibile" da Laboratorio a Laboratorio? Ecco un'occasione per tentare di rispondere a questi ed altri interrogativi.

Per maggiori informazioni vedere pag. 21

Mercoledì 9 giugno

ore 15.00-17.00, Sala Carraresi

PRESENTAZIONE POSTER 1
La Biologia Molecolare nello studio della patologia cardiovascolare

Moderatori: M. Pazzagli (Firenze), G.V. Melzi d'Eril (Varese)

- Presentazione della Sessione
- Effetti dei polimorfismi del gpib e del vwf sul rischio di infarto miocardico in un campione di giovani sardi
  Musino L.; Rossi R.; Partenza A.; Barca M.; Bitti PP; Carru C.; Deiana L. (Sassari/Nuoro)
  (poster **035**)
- C677t polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a risk factor of adverse events after coronary revascularization
  Botto N., Federici C., Manfredi S., Hellies A., Rizza A., Berti S., Bevilacqua S., Biagini A., Andreassi MG. (Massa)
  (poster **051**)
- Amyloid beta precursor protein (abpp) mutations and apolipoprotein e alleles in italian patients affected by hereditary cerebral amyloid angiopathy
  Donadei S., Obici L., Marciano S., Moratti R., Melzi d'Eril G.V., Merlini G. (Pavia/Varese)
  (poster **037**)
- Methodological assessment of mRNA expression of endothelin receptors in pig heart and coronary arteries
  Del Ry S., Vitale R.L., Colotti C., Piersigilli A., Giannessi D. (Pisa)
  (poster **022**)
- Homocysteine determinants in patients with advanced coronary and/ or valvular heart disease
  Federici C.; Botto N.; Storti S.; Hellies A.; Manfredi S.; Biagini A.; Clerico A.; Andreassi M.G.; (Pisa)
  (poster **055**)
- Frequenza di polimorfismi legati al rischio trombotico in liceo scientifico cittadino
  Sabatini L.,Fineschi D., Pescaglini M ,.Raffaelli N., Gasparri L.,Pasquoni ML. (Siena)
  (poster **053**)
- Prevalence of myosin binding protein-c gene mutations and evidence of an association with systolic dysfunction and end-stage progression.
  Girolami F.; Olivotto I.; Passerini I.; Vargiu D.; Cecchi F.; Torricelli F.; (Firenze)
  (poster **047**)
- Ruolo della e-selectina nella patogenesi dell'aneurisma aortico addominale
  Cecchini F.; La Torre A.; Biondi M.L.; Ghilardi G.; Guagnellini E.; (Milano)
  (poster **016**)
- Significato predittivo delle alterazioni molecolari dell'enzima mthfr nella cardiopatia ischemica
  Bianchi L., Venturi C., Botoni M., Vergoni W. (Pistoia)
  (poster **017**)

ore 15.00-17.15, Sala C

SESSIONE Sponsorizzata 1
DADE BEHRING
Integrazione tra laboratorio e clinica nella gestione del paziente malnutrito

Moderatori: M. Plebani (Padova), A. Fusco (Roma)

- La malnutrizione : il punto di vista della direzione aziendale
  G. Martiny (Lavagna, GE)
- La malnutrizione ospedaliera nel 3° millennio: luci ed ombre
  S. Sukkar (Genova)
- Implementing the French National Guidelines for malnutrition screening in the Rouen University Hospital
  P. Déchelotte (Ruen, Francia)
- La gestione della malnutrizione nei pazienti ricoverati: una realtà consolidata nell'ASL 4 Chiavarese
  G. Devoto (Lavagna, GE)

Mercoledì 9 giugno

ore 15.00-16.00, Sala E

SESSIONE Sponsorizzata 2
ABBOTT
AxSYM BNP: utilità clinica e prime valutazioni italiane

Moderatori: M. Tocchini (Ancona), G. Zucchelli (Pisa)

- Introduzione - G. Zucchelli (Pisa)
- La determinazione del BNP: fisiologia e clinica
  M. Emdin, C. Passino (Pisa)
- Il test AxSYM BNP: valutazione analitica e clinica
  R. Schiavon (Legnago, VR)
- La determinazione del BNP: metodi a confronto
  C. Prontera, S. Storti (Pisa)
- Conclusioni - M. Tocchini (Ancona)

ore 15.00-16.00, Sala G

SESSIONE Sponsorizzata 3
TOSOH BIOSCIENCE
Nuovi orizzonti nell'automazione di laboratorio

Moderatore: P.A. Bonini (Milano)

- L'automazione del laboratorio ai giorni nostri: una sfida da vincere
  G.A. Pedrazzini (Milano)
- L'automazione di laboratorio per ottimizzare i processi e ridefinire le competenze
  M. Murone, F. Ferrara (Milano)
- Discussione

ore 16.15-17.15, Sala E

SESSIONE Sponsorizzata 4
INSTRUMENTATION LABORATORY
iQM : Il nuovo Paradigma della Qualità in Emogasanalisi

Moderatore: F. Ceriotti (Milano)

- iQM: The new approach to Quality
  J.O. Westgard (Wisconsin, USA)
- Come l'iQM si rapporta alle Linee Guida regionali/ nazionali sul Controllo di Qualità
  F. Ceriotti (Milano)
- Gestione, supervisione, vantaggi organizzativi con l'iQM in emogasanalisi: l'esperienza di un contesto organizzativo avanzato
  M. Bertona (Desio, MI)

è previsto il servizio di traduzione simultanea

ore 16.15-17.15, Sala G

SESSIONE Sponsorizzata 5
BECKMAN COULTER
Medicina predittiva e genomica

Moderatori: G. Federici (Roma), G. Messeri (Firenze)

- Introduzione - Significato, limiti e prospettive
  G. Novelli (Roma)
- Tecnologie avanzate per la diagnostica molecolare del futuro
  M. Ferrari (Milano)
- Biotecnologie: i nuovi scenari per l'etica
  F. Torricelli (Firenze)

ore 19.00, Sala C

PREMIAZIONE DEI MIGLIORI POSTER AMCLI e SIBIOC

Giovedì 10 giugno

ore 9.00-10.00, Sala C

LETTURA PLENARIA 2

Presentazione: M. Plebani (Padova)

- La Medicina Molecolare: attualità e prospettive
  F. Salvatore (Napoli)

ore 10.15-12.45, Sala C

SESSIONE 4

Trombofilie: dalle molecole al fenotipo

Moderatori: G. Castaldo (Napoli), M. Ferrari (Milano)

- Modulatori dell'emostasi: dai polimorfismi funzionali alla terapia.
  F. Bernardi (Ferrara)
- Il laboratorio "tradizionale" nella clinica delle trombofilie
  A. D'Angelo (Milano)

Comunicazioni selezionate:

- Scanning e identificazione di varianti nei geni della ferritina umana
  L. Cremonesi (Milano)
- Frequenza della mutazione G20210A della protrombina in pazienti neurologici con ischemia cerebrale
  C. Stefanin (Legnano)

Moderatore: E. Ascari (Brescia)

- Discussione di casi clinici con il pubblico
  M. C. Patrosso (Torino)

ore 10.15-12.45, Sala E

SESSIONE 5

Biochimica clinica ed ematologia dell'esercizio fisico

Moderatori: G. Banfi (Milano), R. Pacifici (Roma)

- Il ruolo del laboratorio nel monitoraggio biochimico dell'atleta
  A. Dolci (Milano)
- Variazione degli indici ematologici nell'esercizio fisico
  G. Lippi (Verona)
- Reticolociti e "nuovi" parametri ematologici nell'esercizio fisico
  G. D'Onofrio (Roma)
- Ormoni e attività sportiva: significato delle analisi biochimiche di laboratorio
  E. De Palo (Padova)
- Doping/Antidoping: attualità e prospettive future
  D. D'Ottavio (Roma)

Comunicazioni selezionate:

- Valutazione di parametri biochimici ed ormonali in atleti agonisti in condizioni di riposo e durante attività sportiva
  D. Faggian (Padova)
- Le isoforme della cpk nella valutazione dello stress muscolare durante test ergometrico massimale
  G. Tamaro (Trieste)

Giovedì 10 giugno

ore 10.15-12.45, Sala G

SESSIONE 6

Il CQI in laboratorio, passaggio obbligato per la qualità dell'informazione

Moderatori: G. Manganaro (Venezia Mestre),
P. Bonvicini (Padova)

- Gestione del Controllo di qualità in un laboratorio d'urgenza
  E. Schiavon (Padova)
- La gestione del CQI in un sistema di Lab-Automation (area biochimica)
  P. Valentino (Bari)
- Tempo di Protrombina: CQI e allineamento di due strumenti
  S. Ferrarese (Venezia Mestre)
- Il CQI e la variabilità biologica: alcune applicazioni pratiche in ambiente Excel
  C. Romano (Chieti)

Comunicazioni selezionate:

- Riproducibilità dei parametri ematologici su due differenti analizzatori automatici
  I. Bertoli (Venezia)
- Planning of internal quality control procedures: Our experience on application of analytical goals
  C. Callà (Roma)

ore 13.15-14.15

A COLAZIONE CON L'ESPERTO

- **Marcatori biochimici del metabolismo osseo**
  M. Zaninotto
  Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Az.Osp. Padova

  Gli aspetti biochimici peculiari del metabolismo osseo, consentono di identificare marcatori biochimici il cui dosaggio fornisce informazioni sensibili e specifiche sulle fasi di neoformazione e riassorbimento del turnover metabolico. Si cercherà di condurre un riesame critico su razionale di utilizzo, metodologie analitiche, modalità di refertazione delle determinazioni dei marcatori di turnover osseo, e cioè di aspetti che, in questi ultimi anni, appaiono ormai consolidati oltre a delineare le nuove prospettive biochimiche con la descrizione di nuovi marcatori biochimici e del loro possibile utilizzo clinico.

- **Verso un laboratorio accreditato, certificato….. di qualità**
  A. Cremaschi
  Ufficio Qualità, Ospedale Treviglio (BG)

  Dibattito sulla necessità dell'implementazione di un Sistema di Qualità, qualunque possa essere la politica regionale di recepimento delle istanze relative all'accreditamento secondo il DPR 14.01.1997 sui Requisiti minimi. Il Sistema di Gestione per la Qualità, che non solo è il presupposto per ottenere il riconoscimento di un Accreditamento Professionale e/o di una Certificazione ISO 9001:2000, ma rappresenta la condizione indispensabile per consentire alla Direzione del Laboratorio di verificare il raggiungimento dei propri obiettivi.

- **Linee guida in Medicina di Laboratorio**
  T. Trenti
  Dipartimento di Patologia Clinica, Ausl di Modena

  Le linee guida sono divenute strumento di sempre maggiore popolarità, impatto ed uso nella pratica medica. Il test diagnostico presenta tuttavia peculiarità che rendono di relativa difficoltà lo sviluppo di linee guida nel processo clinico diagnostico orientate alla EBM: discussione dei suggerimenti del comitato Evidence Based Laboratory Medicine dell'IFCC relativamente alle linee guida sul test diagnostico.

- **Peptidi natriuretici: utilità diagnostica e prognostica**
  A. Clerico
  Laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare, Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

  Molti studi dimostrano come questi ormoni svolgano un ruolo importante nella fisiopatologia dello scompenso cardiaco ed hanno suggerito l'utilità diagnostica e/o prognostica del loro dosaggio, soprattutto del BNP (Brain Natriuretic Peptide), sia in pazienti con scompenso cardiaco che con sindrome coronarica acuta.

Giovedì 10 giugno

■ **Il ruolo del laboratorio nella diagnostica delle leucemie**

A. La Gioia

Laboratorio Analisi, Presidio Ospedaliero di Livorno

La diagnostica ematologica automatizzata è in grado di fornire attualmente informazioni aggiuntive rispetto ai soli dati quantitativi. La capacità di "lettura" di queste informazioni è un importante ausilio nella successiva valutazione morfologica al microscopio. La qualità della risposta offerta dal laboratorio costituisce quindi la condizione necessaria per la gestione di successivi algoritmi diagnostici basati sull'uso razionale ed appropriato delle indagini citochimiche, citogenetiche, citofluorimetriche e molecolari.

■ **Marcatori tumorali: linee guida per il corretto utilizzo**

M Gion

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Sanitaria, Venezia

I biomarcatori oncologici tradizionali vengono richiesti ancora oggi in modo inappropriato in una percentuale non trascurabili di casi. L'utilizzo inappropriato genera l'impressione che i biomarcatori siano inefficaci e riduce l'interesse degli specialisti per questi test diagnostici, sia dal punto di vista applicativo che di ricerca. Questa situazione sembra particolarmente preoccupante in vista di una ottimale valutazione ed un efficace impiego clinico dei biomarcatori che saranno resi disponibili dalle nuove tecnologie emergenti (genomica, proteomica). Durante la colazione discuteremo su come far tesoro della passata esperienza sui biomarcatori tradizionali per gestire meglio i nuovi biomarcatori.

■ **Diagnostica biochimica della Sindrome di Down**

M. Perona

S.C. chimica analitica, A.O. OIRM-S. Anna, Torino

Un recente studio mette a confronto le diverse strategie di screening: l' esperto risponderà a quanti vogliano valutare sia a priori che a posteriori la validità e/o l'applicabilità della strategia scelta. Verranno presentati e messi a confronto i risultati ottenibili con le diverse strategie sulla popolazione del centro di Torino; verranno altresì poste in particolare evidenza le condizioni preliminari ad ogni possibile scelta.

■ **Fattori di rischio cardiovascolari**

G. Guidi

Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche ed Ematologiche - Policlinico "G. Rossi", B. Roma - Verona

I risultati di numerose ricerche cliniche stanno evidenziando la crescente importanza di nuovi fattori di rischio cardiovascolare che si aggiungono a quelli tradizionali.
Nell'incontro si discuterà dell'interazione fra questi, come la Proteina C Reattiva, alcuni enzimi antiossidanti (PON, Glutatione Perossidasi) e nuovi marcatori di attivazione piastrinica, e quelli tradizionali e delle attuali metodologie di indagine.

■ **Il laboratorio di coagulazione nella sepsi grave**

P. Carraro

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Az.Osp. Padova

Da diversi anni il laboratorio di coagulazione fornisce dati importanti per la gestione del paziente critico con sepsi e coagulopatia da consumo. Recentemente si sono affacciate nuove possibilità diagnostiche e terapeutiche (proteina C attivata e non attivata, antiaggreganti) che hanno implicazioni importanti nell'organizzazione del laboratorio. Potranno essere quindi discusse e confrontate esperienze specifiche in questo campo.

■ **Specifiche di qualità nel laboratorio clinico**

F. Ceriotti

Ospedale San Raffaele, Milano

La conversazione verterà sulle modalità con cui definire i traguardi analitici, vantaggi e limiti di vari approcci ed utilizzo dei traguardi analitici nella pratica quotidiana.

Per maggiori informazioni vedere pag. 21

Giovedì 10 giugno

ore 15.00-17.00, Sala Carraresi

PRESENTAZIONE POSTER 2
Coagulazione, ematologia, immunologia

Moderatore: E. Ascari (Brescia)

- Presentazione della Sessione

Prima parte - Coagulazione

- Assessment of the thrombophilic risk in women candidates to hormone replacement therapy
  Consiglio P.; De Michele S.; Salvia M.; Tusa G.; Calabrò G.; Aiosa A.; Di Maio C.; Faranna C.; Ingrassia A.; Maratta A.; Trapani M.R.; Vitale G.; Amato G.; Lombino F.; Di Natale R.; Menozzi I.; (Palermo)
  (poster **069**)

- D-dimero: importante indicatore in profilassi anti-tvp dopo chirururgia ortopedica maggiore degli arti inferiori
  Troglia G., Bosio K., Vinai E., Di Matteo F. (Boves, CN)
  (poster **070**)

- Hyperhomocysteinemia and retinal vein thrombosis
  De Stasio G.; Barillari G.; Roman D.; Giacomello R.; Dello Russo P.; Biffoni F.; B andello F.; Gonano F.; (Udine)
  (poster **072**)

Seconda parte - Ematologia

- Protocollo diagnostico per le anemie emolitiche da difetto congenito delle proteine della membrana eritrocitaria
  Caprari P., Tarzia A., Caforio M.P., Salvati A.M (Roma)
  (poster **116**)

- La conta monocitaria: valutazione di tre analizzatori ematologici vs citofluorimetria e citochimica.
  La Gioia A., Chiapponi I., Fiorini M., Matteucci A., Petricci P., Russo G., Balagi S., Batistoni A., Fedi S., Ghinami F., Hurle C.,Manzin A., Sabatini M. (Livorno)
  (poster **112**)

- Confronto tra due diverse modalita' di somministrazione di ferro gluconato: studio in pazienti in dialisi peritoneale
  Ippolito S.; Novembrino C.; Lonati S.; Bamonti F.; De Vecchi A. (Milano)
  (poster **101**)

Terza parte - Immunologia

- Gli anti actina IgA nel morbo celiaco, valutazioni metodologiche preliminari
  Brusca I.; Carroccio A.; Pirrone A.; Teresi S.; La Chiusa S.M. (Palermo)
  (poster **158**)

- Discussione finale e conclusioni della sessione

ore 15.00-16.00, Sala C

SESSIONE Sponsorizzata 6
PHARMACIA DIAGNOSTICS
Allergia in focus: nuovi orientamenti per la clinica ed il laboratorio

Moderatori: M. Plebani (Padova), F. Bonifazi (Ancona)

- I vantaggi del dosaggio in vitro quantitativo
  M. Plebani (Padova)

- L'utilità del controllo di qualità nella diagnostica allergologica in vitro
  P.M. Gerthoux (Desio, MI)

- Discussione

ore 15.00-16.30, Sala E

SESSIONE Sponsorizzata 7
A.MENARINI DIAGNOSTICS
Esame del sedimento urinario: stato dell'arte e prospettive

Moderatori: P. Bonvicini (Padova),
P. Cappelletti (Pordenone)

- Cosa si aspetta il clinico dall'esame del sedimento urinario
  C. Cascone (Padova)

- Cosa può offrire il laboratorista
  M.L. Gozzo (Roma)

- Cosa dicono (e non dicono) le linee-guida internazionali
  B. Pirovano (Treviglio, BG)

- VEQ: esperienza dei primi 3 anni
  GB. Fogazzi (Milano)

ore 15.00-16.00 Sala G

SESSIONE Sponsorizzata 8
DIANOEMA
Dai progetti di laboratorio verso i progetti territoriali

Moderatore: G. Messeri (Firenze)

- Progetto di riferimento per il collegamento dei reparti nell'Azienda Ospedaliera Carlo Poma di Mantova
  F. Manzato, S. Roli (Mantova)

- L'Azienda ULSS 15 Alta Padovana: il Data Repository Clinico nel Laboratorio di Area Vasta
  L. Bacelle (Padova)

Giovedì 10 giugno

ore 16.15-17.15, Sala C

SESSIONE Sponsorizzata 9
ROCHE DIAGNOSTICS
L' informazione del Laboratorio nella gestione del paziente

Moderatore: M. Plebani (Padova)

- Introduzione - M. Plebani (Padova)
- Importanza diagnostica e prognostica dei Peptidi Natriuretici nelle Malattie Cardiovascolari
  A. Clerico (Pisa)
- Il contributo del Laboratorio nelle diagnosi di Embolia Polmonare e Trombosi Venosa Profonda
  C. Legnani (Bologna)
- Discussione

ore 16.45-17.45, Sala E

SESSIONE Sponsorizzata 10
BAYER
BNP marker per la diagnosi dello scompenso cardiaco e nuovi sviluppi diagnostici

Moderatori: C. Ottomano (Bergamo), G. Guidi (Verona)

- La determinazione dei peptidi natriuretici: la prospettiva del cardiologo
  G.M. Boffa (Padova)
- La determinazione del BNP: dalla sperimentazione alla pratica clinica
  M. Zaninotto (Padova)
- Metodo BNP ADVIA Centaur: Performance analitica e valutazione
  F. Di Serio (Bari)

ore 16.15-18.15, Sala G

SESSIONE Sponsorizzata 11
DIASORIN
La Proteina S100B come marcatore biochimico di patologia umana

Moderatore: M. Plebani (Padova)

- S100B protein, biochemistry and functional role
  A.C. Aronsson (Täby, Svezia)
- Problematiche analitiche della determinazione dell'S100B
  S. Faggian (Padova)
- La proteina S100B in Medicina Perinatale
  D. Gazzolo (Genova)
- La proteina S-100b nella patologia cerebrovascolare
  A. Burlina (Padova)
- S100 nel follow up del paziente con melanoma
  R. Dorizzi (Verona)

è previsto il servizio di traduzione simultanea

ore 17.30-18.30, Sala C

SESSIONE Sponsorizzata 12
A. DE MORI
Nuove prospettive per la determinazione della Troponina I cardiaca

Moderatori: C. Franzini (Milano), M. Panteghini (Brescia)

- Principali obiettivi per la nuova generazione dei metodi di misura della Troponina I
  M. Panteghini (Brescia)
- L'esperienza con la Troponina I AIO ! di seconda generazione
  F. Pagani (Brescia)

ore 18.30-19.30, Sala C

ASSEMBLEA DEI SOCI

Venerdì 11 giugno

ore 9.00-10.00, Sala C

LETTURA PLENARIA 3

Presentazione: M. Plebani (Padova)

- L'encefalopatia spongiforme
  M. Pocchiari (Roma)

ore 10.15-13.00, Sala C

SESSIONE 7
Comune AMCLI-SIBioC
Il Laboratorio nella Encefalopatia spongiforme

Moderatori: M. Pocchiari (Roma),
F. M. Cancellotti (Padova)

- Biologia dei prioni
  F. Tagliavini (Milano)
- Coinvolgimento del sistema olfattorio nelle TSE umane ed animali
  G. Zanusso (Verona)
- Strategie per il controllo delle TSE animali in Italia
  F. Mutinelli (Padova)
- Influenza dei polimorfismi del gene della PrP sulla patogenesi delle EST negli ovini
  U. Agrimi (Roma)
- Inattivazione degli agenti delle encefalopatie spongiformi trasmissibili mediante trattamenti ad alta pressione
  F. Cardone (Roma)

Sessione Sponsorizzata da BIO-RAD

ore 10.00-13.00, Sala E

SESSIONE 8
Immunometria oggi

Modeeratori: G. Messeri (Firenze), C. Dotti (Reggio Emilia)

- Immunometria fra specificità ed integrazione
  G. Messeri (Firenze)
- New technologies for multiplexed immunoassays
  S.R. Binder (Hercules ,USA)
- I saggi immunometrici fra complessità e innovazione: il caso del paratormone
  M. Migliardi (Torino)
- Miglioramento della qualità analitica dei saggi immunometrici per ormoni e marcatori tumorali
  G.C. Zucchelli (Pisa), A.Pilo (Pisa)

  Comunicazione selezionata:
- Determinazione di cortisolo ed aldosterone nelle urine: l'automazione non risolve i problemi di specificità
  A. Fortunato (Vicenza)

ore 13.00-13.30, Sala C

CHIUSURA COMUNE DEI CONGRESSI AMCLI e SIBioC

Altri incontri congressuali

Riunioni dei SOCI DIPLOMATI e dei SOCI ORDINARI con le diverse lauree

mercoledì ore 17.30-18.30
9 giugno Sale C, E, G, e Palladio

Riunioni VARIE

- mercoledì 9, 15.00-18.00, Sala B
  Riunione APL Accreditamento, farmaco tossicologia
- giovedì 10, 17.00-18.00, Sala B
  Riunione dei partecipanti al programma di formazione a distanza: Casi Clinici e quesiti di Medicina di Laboratorio

Riunioni RISERVATE

- giovedì 10, 15.00-18.00, Saletta ex Archivio
  Riunione Gruppo di Studio Enzimi

Riunioni GRUPPI DI STUDIO

Le Riunioni dei Gruppi di Studio SIBioC hanno la finalità principale di mettere in contatto i coordinatori dei Gruppi di Studio con i partecipanti al Congresso.
Rappresentano, inoltre, un'occasione per fare un consuntivo delle attività già svolte, per presentare quelle programmate per l'anno successivo e per raccogliere commenti e proposte.
Non è prevista alcuna prenotazione per partecipare alle riunioni e non vi sono limitazioni numeriche all'accesso.

mercoledì 9 giugno

- ore 10.15-11.15, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio **Colture Cellulari**
  Coordinatore: V. Chigorno (Segrate, MI)

- ore 11.30-12.30, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio **Enzimi**
  Coordinatore: M. Panteghini (Brescia)
  Sommario degli argomenti:
  1. Stato delle attività di standardizzazione internazionali (tracciabilità, nuovi metodi di riferimento, ecc.).
  2. Progetto EC4-Calibration 2000 per la verifica della tracciabilità delle determinazione enzimatiche.
  3. Risultati della indagine relativa all'impiego della determinazione della colinesterasi sierica.
  4. Nuova indagine relativa all'impiego della determinazione della lipasi pancreatica.
  Altre ininziative in cantiere.

- ore 11.30-12.30, Sala B
  Riunione Gruppo di Studio
  Fattori di rischio cardiovascolari
  Coordinatore: A. Catapano (Milano)
  Sommario degli argomenti:
  La riunione congiunta dei Gruppi di Studio Lipidi , lipoproteine e fattori di rischio cardiovascolare si propone l'obiettivo di esplicitare il programma di attività da svolgersi durante quest'anno.
  In particolare si ritiene opportuno considerare una analisi critica delle nuove metodiche per la determinazione dei livelli di lipoproteine circolanti e di quelle relative ai nuovi markers di rischio cardiovascolare, quali ,ad esempio, proteina C reattiva, fattore NBP, omocisteina, ecc.

- ore 15.00-16.00, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio
  Medicina di Laboratorio basata sull'evidenza
  Coordinatore: T. Trenti (Pavullo nel Frignano, MO)
  Sommario degli argomenti:
  La Evidence Based Medicine nella sua applicazione alla Medicina di Laboratorio o Evidence Based Laboratory Medicine ha come fine una ricerca che combinando le metodologie proprie dell'epidemiologia clinica, della statistica e delle scienze sociali alle tradizionali conoscenze fisiopatologiche permetta di valutare il ruolo delle procedure diagnostiche nel processo di decisionale clinico con una enfasi particolare sui risultati di salute ottenuti. La riunione del Gruppo di Studio EBLM di Sibioc ha lo scopo di individuare, sviluppare e porre in atto le migliori attività formative per conoscere gli strumenti per valutare la robustezza di un lavoro scientifico, per sviluppare revisione sistematiche e linee guida in ambito diagnostico promuovendo il Governo Clinico in Medicina di Laboratorio.

giovedì 10 giugno

- ore 10.15-11.15, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio
  Proteoma in Biochimica Clinica
  Coordinatore: M. Galli Kienle (Milano)
  Sommario degli argomenti:
  1) Relazione sulle attività del gruppo
  2) Attività di Società correlate
  3) Programma 2004-2005

- ore 11.30-12.30, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio **Proteine**
  Coordinatore: G. Merlini (Pavia)
  Sommario degli argomenti:
  1) Stato del documento sulle implicazioni del consolidamento delle analisi delle proteine nei liquidi
  biologici. Responsabile di questo progetto è Mariastella Graziani.
  2) Stato del documento sulla metodologia di studio delle componenti monoclonali nei liquidi biologici.
  Nell'introduzione di questo documento sarà trattato anche il problema dell'appropriatezza della richiesta. Responsabile di questo progetto è Giampaolo Merlini.
  3) Rendiconto dei contatti avuti con "Association of Clinical Biochemists UK".
  4) Programma del Corso "Le proteine dal laboratorio alla clinica" che si svolgerà a Verona il 27-29 ottobre 2004
  5) Proposta di nuove iniziative.

Altri incontri congressuali

- ore 15.00-16.00, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio
  Diabete Mellito
  Coordinatore: A. Mosca (Milano)
  Sommario degli argomenti:
  - indagine OGTT
  - linee guida screening diabete
  - rapporti Assobiomedica-direttiva diagnostici in vitro
  - pianificazione altre iniziative

- ore 15.00-16.00, Sala B
  Riunione Gruppo di Studio
  Medicina di Laboratorio dello Sport
  Coordinatore: G. Banfi (Milano)

- ore 16.00-17.00, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio
  Marcatori tumorali
  Coordinatore: M. Gion (Venezia)
  Sommario degli argomenti:
  Monitoraggio dell'utilizzo dei biomarcatori di tumore e gestione dei relativi controlli di qualità esterni ed interni nei laboratori italiani: risultati preliminari di una indagine conoscitiva

- ore 17.00-18.00, Sala Palladio
  Riunione Gruppo di Studio
  Screening prenatale della trisomia 21
  Coordinatore: M. Perona (Torino)
  Sommario degli argomenti:
  Condivisione delle popolazioni da parte di Laboratori che
  - utilizzano gli stessi metodi/strumenti
  - Test combinato e test integrato : i dati ecografici devono essere accreditati e sottoposti a VEQ
  - Linee guida nazionali : la situazione.
  - Composizione e metodi di lavoro del GdS

A COLAZIONE CON L'ESPERTO

Sono in programma delle 'Colazioni con l'Esperto' nelle giornate di mercoledì 9 e giovedì 10 giugno, dalle ore 13.15 alle 14.15.

La partecipazione è limitata ad un massimo di **10 partecipanti per ciascuna Colazione con l'Esperto**. E' necessario registrarsi in anticipo tramite l'apposita scheda che troverete sul sito www.mzcongressi/medlab, da inviare via fax alla Segreteria Organizzativa (fax 02/6686699) o via e-mail sibioc2004@mzcongressi.com entro il **31 maggio 2004**.

La quota d'iscrizione è gratuita per gli iscritti al Congresso SIBioC con le quote intere (socio o non socio). Per poter partecipare alle "Colazioni con l'Esperto" sarà necessario convertire il proprio buono della colazione di lavoro con quello apposito, consegnandolo in Segreteria Iscrizioni entro le ore 11.30 del giorno dell'incontro.

La quota di partecipazione per gli iscritti a tariffa ridotta o per i nuovi iscritti è **20 Euro**. Sarà necessario versare la quota direttamente a Padova e ritirare presso la Segreteria Iscrizioni l'apposito buono per la Colazione con l'Esperto.

Premi Poster

Premio Domenico Fenili

Il premio consiste in un contributo (di 2500 Euro) messo a disposizione dalla Ditta A. Menarini.

Premio Gilberto Ghin

Il premio consiste in un contributo di 2500 Euro messo a disposizione dalla Ditta Bayer.

Possono concorrere i Soci *SIBioC*, che non superano i 35 anni (al 31/12/2003), primi autori di una presentazione orale o poster. La commissione giudicatrice selezionerà i possibili concorrenti sulla base dei riassunti e li inviterà a presentare il lavoro per esteso entro il 30 aprile 2004, per concorrere al premio.

Premio SIBioC-Ortho-Clinical Diagnostics da 1000 Euro

Premio SIBioC - Roche da 1000 euro

Premio ELAS - SIBioC da 500 euro

Premio SIBioC Enzo Breda - Alifax da 1000 euro

Concorrono ai premi tutti i Soci SIBioC, che non superano i 40 anni (al 31/12/2004), primi autori di una presentazione poster. Gli autori dei poster preselezionati saranno avvisati entro il 30 aprile 2004 e i poster relativi dovranno essere esposti, in uno spazio dedicato, nelle giornate di mercoledì 9 e giovedì 10 giugno.

L'elenco dei vincitori sarà disponibile presso la segreteria SIBioC dopo le ore 17 di mercoledì 9 giugno.
Tutti i primi autori dei poster preselezionati ed esposti, riceveranno in premio **un abbonamento annuale** gratuito alla rivista *CCLM-Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.

La premiazione dei vincitori avrà luogo mercoledì 9 giugno alle ore 19.00 in Sala C.

Informazioni Generali

SEDE DEL CONGRESSO

Fiera di Padova
Via N. Tommaseo, 59 - 35131 Padova
tel. 049/840111 - fax 049/840570- e-mail info@padova fiere.it

SEGRETERIA *SIBioC*

SIBioC - Società Italiana di Biochimica Clinica
e Biologia Molecolare Clinica
Via C. Farini, 81 - 20159 Milano
tel. 02/6887556 - fax 02/6887026
e-mail: segreteria@sibioc.it - internet: www.sibioc.it

La Segreteria SIBioC sarà operativa in sede congressuale per iscrizioni, rinnovi ed informazioni sulle attività associative.
Presso la Segreteria SIBioC si dovranno effettuare le operazioni preliminari alle votazioni per il rinnovo delle cariche sociali.

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

EMMEZETA CONGRESSI
Via C. Farini, 81 - 20159 Milano
tel. 02/66802323 - fax 02/6686699
e-mail sibioc2004@mzcongressi.com
sito congresso: *link da* www.sibioc.it

La **Segreteria Iscrizioni** sarà operativa presso la Fiera di Padova con i seguenti orari:

martedì 8 giugno	15.30 - 19.00
mercoledì 9 giugno	8.30 - 18.30
giovedì 10 giugno	8.30 - 18.00
venerdì 11 giugno	8.30 - 14.30

ACCESSO ALLE SALE - RILEVAMENTO PRESENZE

L'accesso alle sessioni scientifiche è consentito solo agli iscritti al Congresso. Il tesserino portanome (badge), consegnato al momento dell'iscrizione, dovrà essere indossato per tutta la durata del Congresso, poichè sarà effettuata una rilevazione magnetica delle presenze.

Informazioni Generali

CREDITI ECM

I crediti ECM per questo Congresso sono stati richiesti al Ministero della Salute per le seguenti categorie professionali:

- medico chirurgo (per l'area specialistica di microbiologia e virologia, biochimica clinica e patologia clinica)
- biologo (per l'area specialistica di microbiologia e virologia, biochimica clinica e patologia clinica)
- farmacista (per l'area specialistica di biochimica clinica)
- chimico (per l'area specialistica di biochimica clinica e patologia clinica)
- tecnico sanitario laboratorio biomedico

Vi ricordiamo che per avere diritto ai crediti ECM è obbligatorio frequentare il 100% delle ore di formazione. Insieme al badge verrà distribuita una SCHEDA ANAGRAFICA contenente i dati necessari per il rilascio dell'attestato ECM. Tale scheda deve essere compilata immediatamente e consegnata alla Segreteria Iscrizioni.

All'ingresso di ogni sala, verrà consegnata una scheda ECM contenenete questionario di apprendimento, questionario di valutazione e istruzioni per la compilazione.
Le schede dovranno essere riconsegnate in Segreteria Iscrizioni al termine della Sessione.

Qualora il congressista partecipi a più sessioni nelle ulteriori schede ECM è sufficiente indicare soltanto cognome e nome e il numero identificativo riportato sul badge.

ATTESTATI

Gli attestati di partecipazione verranno rilasciati a tutti i partecipanti regolarmente iscritti, per i soli giorni di effettiva presenza al Congresso.
Gli attestati riportanti i crediti formativi verranno spediti succesivamente.

POSTER

I poster dovranno essere esposti nelle giornate di mercoledì 9 e giovedì 10 giugno. E' richiesta la presenza di uno degli autori dalle ore 12.30 alle ore 13.30 dei giorni di esposizione del poster.

MOSTRA SCIENTIFICA E SESSIONI SPONSORIZZATE DALLE AZIENDE

Come parte integrante il Congresso è stata allestita una mostra di apparecchiature e kit diagnostici.
Il programma scientifico è inoltre integrato da sessioni sponsorizzate dalle aziende del settore.

QUOTE DI ISCRIZIONE AL CONGRESSO

A-Quota Socio SIBioC	*350 Euro*
B-Quota non Socio	*425 Euro*
C-Quota speciale non strutturati*	*50 Euro*
D-Quota Giornaliera Socio SIBioC	*140 Euro*
E-Quota Giornaliera non Socio	*170 Euro*
F-Quota Tecnici	*150 Euro*

Importi IVA inclusa

LE QUOTE **A e B** danno diritto a:
- ricevere la borsa contenente il materiale congressuale
- partecipare alle sessioni scientifiche
- ricevere gli attestati di partecipazione ed ECM
- presentare sino a due poster
- partecipare alle colazioni di lavoro di mercoledì 9 e giovedì 10 giugno
- partecipare alla serata sociale di mercoledì 9 giugno, versando una quota di conferma di *5 Euro*

LA QUOTA **C*** (riservata a volontari, borsisti, ecc.) dà diritto a:
- ricevere la borsa contenente il materiale congressuale
- partecipare alle sessioni scientifiche
- ricevere gli attestati di partecipazione ed ECM
- presentare sino a due poster

* *L'iscrizione con tale quota sarà accettata solo dietro presentazione di una dichiarazione del responsabile del Laboratorio o Istituto presso il quale l'interessato presta servizio.*

La quota C è riservata ai giovani che si iscrivono al Congresso autonomamente.
Non può essere sponsorizzata nè da Aziende nè da Enti

LE QUOTE **D e E** danno diritto per un solo giorno di congresso, o per il solo giorno d'iscrizione a:

- ricevere la borsa contenente il materiale congressuale
- partecipare alle sessioni scientifiche
- ricevere gli attestati di partecipazione ed ECM
- partecipare alla colazione di lavoro

La quota **F** (riservata a personale Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, socio AMCLI o SIBioC in regola con il pagamento della quota 2004) comprende il materiale congressuale, la partecipazione alle sessioni scientifiche, attestati di partecipazione ed ECM e le colazioni di lavoro di mercoledì 9 e giovedì 10 giugno.
Tale quota non può essere sponsorizzata.

Informazioni Generali

MODALITÀ DI PAGAMENTO

Il pagamento in sede congressuale può essere effettuato tramite:
- assegno bancario o circolare, non trasferibile, intestato a Emmezeta S.r.l.
- carta di credito, compilando il coupon sulla scheda
- contanti

COME RAGGIUNGERE LA SEDE CONGRESSUALE

❑ *In treno*
dalla Stazione Ferroviaria di Padova 500 metri a piedi

❑ *In auto*
Autostrada Milano-Venezia: uscita Padova Est, nuova brentella Padova Est/Fiera
Autostrada Bologna-Padova: uscita Padova Sud
sono disponibili nelle vicinanze della Fiera quattro ampi parcheggi da 400 a 1300 posti auto

❑ *In aereo*
dall'Aeroporto Marco Polo di Venezia:
- servizio taxi (30 minuti)
- Shuttle per la Fiera (SITA - ogni 30 minuti)

SERVIZIO NAVETTA DURANTE IL CONGRESSO

Sarà organizzato un servizio navetta di collegamento quotidiano tra gli alberghi convenzionati (prenotati tramite l'agenzia ufficiale Selecto) e la Fiera di Padova.

Il servizio verrà effettuato in coincidenza con l'inizio e la fine dei lavori congressuali. Le indicazioni relative a orari e "punti di ritrovo-fermate" saranno esposte nella hall degli hotel convenzionati.

PARCHEGGIO

I congressisti possono usufruire di un'area parcheggio custodita e adiacente la Fiera di Padova, ingresso in Via Goldoni.
Il costo di ogni ingresso è di 4 Euro.

BAR

Situato presso il padiglione 5, è aperto per tutta la durata del Congresso.

COLAZIONI DI LAVORO

Singoli buoni per le colazioni di lavoro sono in vendita presso la Segreteria Iscrizioni al costo unitario di 35 Euro.

GUARDAROBA

E' a disposizione dei congressisti un servizio guardaroba situato nei pressi della Segreteria Iscrizioni.

Programma Sociale

CERIMONIA INAUGURALE

Martedì 8 giugno, ore 17.30
Sala C, Fiera di Padova

SERATA SOCIALE MEDLAB

Mercoledì 9 giugno

ore 19.00: Fiera di Padova, Sala C: **Premiazione dei migliori Poster AMCLI e SIBioC**

ore 19.30: Rinfresco

ore 20.15: Bus navetta per il Teatro Verdi

ore 20.45 **TEATRO VERDI**
Concerto della Polifonica
"Vitaliano Lenguazza" dell'Università di Padova

ore 22.00: Bus navetta per gli alberghi di Padova e Abano. (Per gli hotel situati in Padova centro si consiglia il tragitto a piedi – apposita segnalazione sarà indicata nella hall dei suddetti alberghi)

MODALITA' DI PRENOTAZIONE DELLA SERATA SOCIALE

E' indispensabile confermare la propria presenza alla Serata, versando la quota di conferma – pari a 5 euro – presso la Segreteria Iscrizioni entro e non oltre le ore 13.00 di mercoledì.

Alla conferma verrà consegnato un biglietto numerato corrispondente al numero della poltrona e un ticket che darà diritto all'accesso al Rinfresco previsto in Fiera alle ore 19.30.

Ricordiamo che i posti sono limitati e che potranno accedere al Teatro solo i possessori del biglietto numerato.

Coloro che non intendono partecipare alla Serata Sociale potranno usufruire del servizio navetta per gli hotel convenzionati alle ore 19.30, al termine della Premiazione Poster.

Prenotazioni alberghiere

Per informazioni alberghiere si prega di contattare:

SELECTO S.r.l.
Via R. Da Bari, 108 - 70122 Bari
Tel. 080/5218556 - Fax 080/5245166
e-mail info@selectocongressi.com

ABSTRACT SESSIONI

Mercoledì 9 giugno 2004

- LETTURA PLENARIA LP1
- SESSIONE 1 S1.1 - S1.5
- SESSIONE 2 S2.1 - S2.4
- SESSIONE 3 S3.1 - S3.2

Giovedì 10 giugno 2004

- LETTURA PLENARIA LP2
- SESSIONE 4 S4.1 - S4.3
- SESSIONE 5 S5.1 - S5.7
- SESSIONE 6 S6.1 - S6.5

Venedì 11 giugno 2004

- LETTURA PLENARIA LP3
- SESSIONE 7 S7.1 - S7.3
- SESSIONE 8 S8.1 - S8.5

LETTURA PLENARIA 1
The potential for bias and the need for clear reporting in studies of diagnostic accuracy
Sala C
Mercoledì 9 giugno, ore 9.00-10.00

LP1

THE POTENTIAL FOR BIAS AND THE NEED FOR CLEAR REPORTING IN STUDIES OF DIAGNOSTIC ACCURACY

Patrick M.M. Bossuyt

Dept. Clinical Epidemiology & Biostatistics - Academic Medical Center - University of Amsterdam
the Netherlands

In studies of diagnostic accuracy, the outcomes from one or more tests under evaluation are compared with outcomes from the reference standard, both obtained in subjects who are suspected of having the condition of interest. Diagnostic accuracy can be expressed in many ways, including sensitivity and specificity, likelihood ratios, and the diagnostic odds ratio. There are several potential threats to the validity and generalisability of studies of diagnostic accuracy. Diagnostic studies with specific design features have been shown to be associated with biased, optimistic, estimates of diagnostic accuracy compared to studies without such deficiencies. Complete and accurate reporting should allow the reader to detect the potential for bias in the study and to assess the generalisability and applicability of the results.
The objective of the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) initiative is the improvement of the quality of reporting of diagnostic accuracy studies. Following the successful CONSORT initiative, the STARD initiative aims at the development of a checklist of items that should be included in the report of a study of diagnostic accuracy.
A single page checklist has been published in the first 2003 issues of several journals including Annals of Internal Medicine, Radiology , BMJ, and Clinical Chemistry. Statement and checklist are accompanied by a separate explanatory document, explaining the meaning and rationale of each item and briefly summarizing the available evidence. The documents are also available on several web sites.
The most important sources of bias and lack of applicability have been incorporated in the recently developed QUADAS instrument to evaluate the quality of accuracy studies .
If medical journals adopt the STARD checklist and the flow diagram, the quality of reporting of studies of diagnostic accuracy should improve to the advantage of the clinicians, researchers, reviewers, journals, and the public.

SESSIONE 1
EVIDENCE BASED LABORATORY MEDICINE
LA MEDICINA DI LABORATORIO BASATA SULLE PROVE DI EFFICACIA
Sala C
Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S1.1

EBLM: THE APPLICATION OF EBM TO LABORATORY MEDICINE

Jorgensen P.E.
Odense University Hospital, Denmark

Evidence-based laboratory medicine integrates into clinical decision making:
·the best available research evidence for the use of laboratory tests with
·the clinical expertise of the physician and
·the needs and concerns of the patient.
Appraisal of the best research evidence requires training in how to find and assess the existing evidence as well as familiarity with both the clinical problem and the analytical performance of the specific test. It is important for specialists in clinical biochemistry to provide the best research evidence and this has to be done in a close collaboration with the clinicians. However, it is a difficult task because the methodological quality of many studies on diagnostic tests is poor. And, until now, systematic reviews of diagnostic tests have not been taken up by the Cochrane collaboration. Naturally, high quality studies of the clinical value of laboratory tests are performed, but they are often published outside journals of clinical biochemistry. It is therefore difficult for specialists in clinical biochemistry to keep abreast of the subject.

The present situation is unsatisfactory. A Danish working group on evidence-based use of clinical biochemistry has recently studied the level of evidence presented for the diagnostic accuracy of biochemical tests that were recommended for diagnostic use in the Danish clinical guidelines "Klaringsrapporter" 1996-2001. For ¾ of the recommendations the level of evidence presented was the lowest possible.

In order to improve the situation the methodological quality of studies of the clinical value of laboratory tests has to be improved. The establishment of a system for literature surveillance focusing on such methodologically sound studies would be advantageous. Moreover, training and education on how to find and assess the existing evidence for the clinical use of biochemical tests are needed.

S1.2

HOW TO TRANSFER THE EVIDENCE BASED LABORATORY MEDICINE PRINCIPLES TO ROUTINE PRACTICE. THE STRATEGIES AND THE TOOLS TO BE ADOPTED

Trenti T.

Dipartimento di Patologia Clinica, Ausl di Modena, Ospedale degli Infermi, Pavullo nel Frignano, Modena, Italy

The application of EBM in Laboratory Medicine or Evidence Based Laboratory Medicine (EBLM) is aimed to advance clinical diagnosis by researching and disseminating new knowledge combining methods from clinical epidemiology, statistics and social science with the traditional pathophysiologic molecular approach. Since there is the need to integrate many educational tools to focus the strategy to promote the implementation of best practices to routine practice, the proposal for robust diagnostic test in primary studies, the presence of systematic reviews of high quality, the development of guidelines based on the best scientific evidence, may be useful to promote an a evidence based culture for the appropriateness and effectiveness in laboratory medicine.
A challenge is to transfer the EBLM principles to routine practice to demonstrate an evidence based role of diagnostic tests on patients outcomes as these are not perceived to have a primary role to provide an added values to medical treatments (1). Whereas this is a misguided viewpoint, it indicates the degree of ignorance or misunderstanding that surrounds the value of the diagnostic test and it poses a major challenges for today laboratory professionals (2). Practicing evidence based laboratory medicine has four main dimensions and elements as being a continuous process: the first is the identification of the question, the second is the critical assessment of the best evidence available, the third is the implementation of the best practice and the fourth the maintaining best practice. If the use of a diagnostic test may be defined as an intervention this should be ordered only when a question is asked and when there is proof of evidence that the result can support an adequate answer to the clinical question (3).
Where to find the best evidence. The increasing number of scientific publications and articles require to acquire a searching strategy to guarantee that relevant findings are included and low methodological quality data are excluded when a research "of evidence" is prepared. Strategies for this have been described. The laboratory professionals may be helped in their research by the growing number of scientific journals devoted to summarize the best evidence derived from traditional scientific papers selected according to explicit high quality criteria.
The critical assessment of the best evidence and the critical appraisal about a diagnostic tests. It was proposed a hierarchy

SESSIONE 1
EVIDENCE BASED LABORATORY MEDICINE
LA MEDICINA DI LABORATORIO BASATA SULLE PROVE DI EFFICACIA
Sala C
Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S1.2

of elements to be considered to making an "evidence" decision on the diagnostic test performances. This hierarchy, in the case if laboratory tests, consists in the evaluation of technical performances, diagnostic performances (sensitivity, specificity, likelihood ratios, ROC curve et.), clinical outcomes, organizational impact and cost as clinical and economic benefit ratio.
Systematic review and meta-analysis of evaluations of diagnostic and screening test. Whereas the pivotal role of primary research, the evaluation of data from several studies in a systematic review can be very helpful in the assessment of a diagnostic test. Systematic reviews are not only papers that summarize other papers but they are the summary of the best evidence from primary studies using explicit and reproducible methods to find, critically review and then synthesize the evidence for clinical decision. When statistical methods are used to combine the results of multiple researches the result is a meta-analysis, that is a statistical combination of the data from more than one study after they have been converted into a standard measurement scale.
The implementation of the best practice. The Guidelines and Audit. Maintaining the best practice. The Guidelines and Audit may play a primary role in the implementation and maintaining the best practice. Guidelines are "systematically developed statements to assist practitioner and patients decision about appropriate healthcare for specific clinical circumstances" and they are a tool to help physicians to practice best medicine. Clinical guidelines are not intended as a cookbook medicine leading to a small degree or absence of clinical freedom. The clinical audit will assess whether the test implemented or a new technology is useful or correctly required. As outcome the audit exercise may identify the need to modify practice or may lead to the identification of new question as the necessity to introduce a diagnostic test when necessary in clinical setting. Experience has shown that auditing practice is a means of controlling demand for laboratory service and it can identify motivated clinical needs or abuse and inappropriate use of laboratory services.
All these tools may be useful to promote an a evidence based culture for the appropriateness, efficiency and effectiveness in Laboratory Medicine. EBLM may help laboratory professionals to evaluate and to demonstrate the impact of laboratory test on a broad range of clinical outcomes.

References

1. McQeen MJ. Overview of Evidence Based Madicine: challenges for Evidence-based laboratoty medicine Clin Chem 2001; 47: 1536-1546
2. Price CP. Evidence-based laboratory medicine: supporting decision making Clin Chem 2000; 46: 1041-1050
3. Sackett DL, Haynes RB. Evidence Based of Clinical Diagnosis The architecture of diagnostic research Br Med J 2002; 324: 539-541
4. Trenti T. Evidence-based laboratory medicine as a tool for continous professional improvement Clin Chim Acta 2003; 333: 155-167

S1.3

PERFORMANCE AND DIAGNOSTIC ACCURACY OF BNP AND NT-proBNP IMMUNOASSAYS EVALUATED FOLLOWING EBLM PRINCIPLES

Prontera C., Zucchelli G.C., Zyw L., Poletti R., Mercuri A., Turchi S., Storti S., Passino C., Emdin M., Clerico A.

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

The important role of BNP/proBNP assay in screening and stratification of patients with congestive heart failure, detecting left ventricular systolic and/or diastolic dysfunction, and differential diagnosis of dyspnea has been recently confirmed. Furthermore, it was recommended that BNP/proBNP assay should be included in the first step of the algorithm for the diagnosis of heart failure, although the diagnostic accuracy of this test is still under evaluation following EBLM (Evidence-Based Laboratory Medicine) principles (1). Aim of the present study is the evaluation of analytical performance and diagnostic accuracy of two immunoassays for BNP (IRMA Shionoria, and ADVIA Bayer) and the ECLIA method (Roche) for NT-proBNP. Assay imprecision was checked following the NCCLS guideline; within run and total imprecision (CV%) of ADVIA BNP were 6.2%, 2.2% (at 18.0 ng/L), while 11.0% and 5.1% (at 191.6 ng/L), respectively. For comparison, total imprecision of IRMA BNP was 9.7 CV% at 19.4 ng/L, and 4.4 % at 305 ng/L; while within run and total imprecision of NT-proBNP at concentration of 40.8, 219, and 1736 ng/L were 3.8%, 1.3%, 1.5 %, and 7.6%, 4.0%, and 1.8 %, respectively. Analytical sensitivity was 3.0 ng/L for ADVIA, 2.5 ng/L for IRMA, and 4 ng/L for ECLIA, respectively. Functional sensitivity, computed from the imprecision profile, was 25 ng/L for ADVIA, 40 ng/L for IRMA, and 22 ng/L for ECLIA, respectively. Deming regression analysis gave a close linear relationship (ADVIA = - 8.73 + 0.99 IRMA, r = 0.93, n= 285) between ADVIA and IRMA results. Bland and Altman plot did not find any significant bias between these two immunoassays (mean difference: -9.12 ng/L, 95% CL: –2.0 - 2.75 ng/L). Finally, the accuracy of ADVIA, IRMA and NT-proBNP in discriminating between 68 healthy subjects (45 women and 23 men; mean age 47±12 years) and 210 patients (48 women and 152 men; mean age 65±12 years) with different degree of heart failure (subdivided according to NYHA class) was tested by ROC analysis. Area under the curve (AUC) was 0.907 (95% CI 0.873-0.940) for BNP ADVIA, 0.919 (95% CI 0.888-0.950) for BNP IRMA, and 0.963 (95% CI 0.942-0.984) for NT-proBNP, respectively. When only patients with NYHA class I-II were compared with healthy subjects, the AUCs were 0.862 (95% CI 0.815-0.909) for ADVIA, 0.881 (95% CI 0.835-0.24) for IRMA, and 0.945 (95% CI 0.915-0.976) for NT-proBNP ECLIA, respectively. In conclusion, our data indicate that the two BNP immunoassays show very similar diagnostic accuracy and clinical results. However, the fully automated ADVIA method is more precise and sensitive than IRMA. The NT-proBNP ECLIA method seems to have better analytical performance and diagnostic accuracy than the two BNP immunoassays.

1) Clerico A, Emdin M.Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. Clin Chem. 2004; 50:33-50.

SESSIONE 1
EVIDENCE BASED LABORATORY MEDICINE
LA MEDICINA DI LABORATORIO BASATA SULLE PROVE DI EFFICACIA
Sala C
Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S1.4

QUALITY IN THE SKY: INDICATORS AND ADVERSE EVENTS MANAGEMENT.
TWELVE LABS ARE ON THE ROAD.

1. Vascotto L., 2. Anesi A., 3. Baraghini GF.

1. Laboratorio Ospedale M. Bufalini di Cesena
2. Ospedale Maggiore di Lodi
3. Ufficio Assicurazione Qualità Policlinico di Modena.

GOALS – Since two years a new Working Group (WG) of the "Club della Qualità" (managed by Beppe Carugo, consultant of Roche Diagnostics) is operative. This WG has the objective to identify a set of indicators system able to show the performance of the laboratory and number of the adverse events and mistakes.
METHODOLOGY - About indicators: the WG has identified several indicators (effectiveness, analytical quality,….) and they are going to verify the significance, the comparability and the measurableness comparing the WG laboratories' data. About adverse events: during the Second National Congress of the "Club della Qualità" (november 2003), the WG members decided to collect the data according to a scheme proposed by Baraghini. The results were discussed in a WG meeting in Serramazzoni, near Modena (January, 2004).
RESULTS - in the first step they could register 57 events, and all participants, considering that the experience resulted very interesting, decided to proceed with the data collection supported by a new web database available to all participants of the WG. In this way it should be possible to get personal and group statistical reports and to create a global overview regarding all generated data.
The WG has decided to limit the adverse events collecting only the most important ones from the clinical point of view:
1 – Results not fitting with the clinical data
2 – Not completed diagnostic protocols
3 – Laboratory Reports not complete
4 –Mistakes in the personal data collection of the patient
5 – Delay in the laboratory report deliveries
6 – Tests not carried out
Twelve laboratories have joined this initiative. On February, 23, data collection starts.
CONCLUSIONS - the preliminary phase shows the presence of significant adverse events in all process steps. In some cases, if not correctly managed, those results are like to reduce the credibility of labs activities. Taking into account these facts, we consider this project worthwhile to be developped.
The Partecipants at this project are: Bucci M. (Larino), Manoni R. (Cb), Cavaliere D. (Villa D'Agri), Spagliardi G. (Cinisello), Anesi A. (Lodi), Vascotto L., Mengozzi S., Baldrati L. (Cesena),. Panzali A. (Bs), Giustetto D. (To), Isernia C. (Na), Peruzzini A. (Trento), Baraldi E. (endocrinology, Mo), Rumpianesi F., Venturelli C. (microbiology, Mo), Pietrosemoli P. (virology, Mo), Bolelli G., Franceschetti F. (Bo).

M.D. Silverstein "An approach to Medical Errors and Patient Safety in Laboratory Services" CDC Atlanta, Aprile 2003.

S1.5

TAKING THE CLINICAL LABORATORY SCIENTIST OFF THE ENDANGERED SPECIES LIST

Giocoli G.1, Pauri P.1,2, Ricci L.1,3, Tranquillo M. 1,4, Trenti T.5,6, Urbano P.1,7

1 GdL EBM AMCLI, Milano; 2 UO Virologia, AO Umberto I, Ancona; 3UO Microbiologia e Virologia, AO SMN, Reggio Emilia; 4 Ist Zooprofil Sper Lombardia-Emilia, Brescia 5GdS EBM SIBioC, Milano; 6 UO Patologia Clinica, Osp. Pavullo n/F (MO); 7 Dip. Sanità Pubblica, Sez. Microbiologia, Univ. Studi, Firenze.

High technology of modern diagnostic tests cannot guarantee the accuracy of outcomes, so diagnostic efficacy of tests has to be proven by people having the necessary expertise. A problem in Italy is forming, supporting and preserving professional identity of clinical laboratory scientists (CLS), in the present era of diagnostic services consolidation. Besides, knowledge created within this professional community should be made useful to other professionals, policy-makers and administrators in the health system. We consider knowledge transfer as a CLS's duty, with the aim to help close the gap between evidence and clinical practice.
Methods. In the course of 2003 one of us (GG) carried out a search for primary and review articles on evidence-based teaching, besides attending the debate "Evidence for evidence-based practice" in the Evidence-Based Health Care (EBHC-NHS) discussion list.
Results. In each professional community Continuous Medical Education (CME) and Continuous Professional Development (CPD) are primarily teacher and learner driven and are unable to address questions of population health or attend to issues of the clinical environment (1).
Knowledge translation (KT) offers a more comprehensive construct, subsuming and building on CME and CPD. KT is set within the practice of health care and focuses on changing health outcomes using evidence based clinical knowledge (1).
Knowledge brokering (KB) can be considered a tool to put KT into practice. KB goes well beyond the standard notion of transfer as a collection of activities that helps move information from a source to a recipient. Brokering focuses on identifying and bringing together people interested in an issue, people who can help each other develop evidence-based solutions.
Conclusions. The researcher who informs health-system administrators about new findings is doing knowledge transfer but not brokering. The same communications specialist acting as a liaison for the ministry, building a network of academic contacts, and helping policy planners to develop evidence-gathering projects is brokering instead. "The broker role is about bringing people together" (2).

1. The case for knowledge translation: shortening the journey from evidence to effect. Dave Davis, et al. BMJ 2003;327:33–5
2. The Theory and Practice of Knowledge Brokering. Canadian Health Service Research Foundation, 2003 (www.chrsf.ca).

SESSIONE 2

ANALISI URGENTI: QUALI, QUANDO, COME, DOVE? IL "PUNTO" SUL POC (T)

Sala E

Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S2.1

L'INFORMAZIONE DI LABORATORIO IN URGENZA: FRA CONSOLIDAMENTO E POCT

Mario Plebani

Dipartimento di Medicina di Laboratorio. Azienda Ospedaliera-Università di Padova

Nelle ultime decadi, i laboratori clinici hanno dimostrato di saper migliorare enormemente e progressivamente la loro produttività totale, la produttività per singolo addetto ed il costo per test. Se si esamina, invece, il tempo di risposta, definito come tempo intercorrente dal momento in cui viene richiesto l'esame al momento in cui il clinico riceve realmente il risultato (TAT, turnaround time), si può osservare come, sicuramente negli Ospedali americani e probabilmente in quelli del nostro Paese, nell'ultima decade non si siano registrati miglioramenti significativi.

Ciò deriva, almeno in parte, dal fatto che attualmente le variabili che incidono maggiormente nel determinare il TAT non sono di tipo analitico, e quindi non risentono dei progressi nell'automazione, ma sono invece di natura pre-analitica (raccolta e trasporto dei campioni) e post-analitica (refertazione e reale accesso ai risultati da parte dei clinici). Anche nei casi in cui i risultati vengono refertati tardivamente rispetto alle specifiche di prestazione concordate, le cause sono legate solo in una percentuale modesta (28%) di casi a problemi analitici, mentre, ancora una volta le fasi pre-e post-analitiche appaiono più vulnerabili.

Accanto a quest'evidenza, di fronte al mutamento della funzione degli Ospedali, sempre più votati alla diagnosi e cura delle patologie acute, e di fronte all'esigenza di contenere i costi, semplificare le procedure operative e migliorare l'efficienza, molti laboratori clinici hanno sposato la teoria del consolidamento degli esami urgenti nell'attività in elezione, anche grazie alla maggior produttività e versatilità della strumentazione oggi disponibile. Questa decisione ha reso e rende ancor più appetibile e necessario, almeno apparentemente, il ricorso alla pratica delle analisi decentrate, oggi più diffusamente chiamate Point-of-care testing (POCT) per l'esigenza del clinico di disporre dell'informazione di laboratorio in tempo utile per la decisione e la gestione del paziente. Infatti, specialmente nelle Istituzioni più complesse, l'inserimento dell'urgenza/emergenza all'interno della pratica in elezione, seppur vista in un'ottica tesa ad assicurare risposte tempestive a tutti i campioni ed a tutti i pazienti, porta ad ottenere dei TAT rapidi ma non tali da soddisfare il clinico e le esigenze cliniche delle urgenze reali.

La revisione della letteratura corrente e l'attento esame delle esperienze di vari Istituzioni sanitarie, dimostrano, in sintesi, che:

a) Non vi sono evidenze certe a favore o contrarie alla pratica del POCT. Non è provato in modo inequivocabile che il POCT riduca il tempo di degenza, acceleri la dismissione e soprattutto migliori gli esiti clinici per il paziente.
b) L'espansione di una pratica POCT ingiustificata ed irrazionale determina maggiori costi e maggiori problemi rispetto al miglioramento dell'informazione clinica
c) L'opportunità del ricorso al POCT va valutata attentamente conoscendo la realtà della singola Istituzione, ed in ogni caso non può essere un'alibi rispetto alla disorganizzazione o al mancato governo dei processi
d) La pratica del POCT, dal punto di vista strettamente clinico, dovrebbe essere ristretta alla determinazione di funzioni vitali che necessitano di risposte terapeutiche immediate, come nel caso del glucosio e, forse, dei marcatori cardiaci. Negli altri casi, il POCT è un surrogato di disfunzioni organizzative o rappresenta, comunque, un approccio organizzativo alla soluzione di problemi che non sono strettamente clinici.
e) La rapidità di risposta può essere un danno anziché un reale vantaggio se non si coniuga, sempre e comunque, con la qualità dell'informazione di laboratorio.
f) Solo un efficace lavoro multidisciplinare è garanzia di razionalità ed efficacia nell'implementazione del POCT o comunque di una politica coerente per assicurare informazioni di laboratorio rapide e di elevata qualità.

E' tempo, pertanto, di ripartire nella valutazione delle reali necessità cliniche per definire le specifiche di qualità dell'esame di laboratorio e, fra queste, le specifiche legate al tempo di risposta. Un'evidenza ben dimostrata nel paziente ammesso ad un Dipartimento di Emergenza, è quella di carenze informative, e fra queste la mancata, immediata accessibilità ad informazioni sui risultati di esami di laboratorio già effettuati. In molti casi, quindi, la richiesta di esami urgenti, e conseguentemente la necessità di attivare POCT è più legata a queste carenze informative che a vere e proprie necessità cliniche.

La centralità del paziente nello stabilire, implementare e monitorare il TAT è l'unica risposta agli interrogativi legati all'efficienza e all'efficacia dei modelli organizzativi che devono essere adottati per assicurare una diagnostica di laboratorio tempestiva nell'urgenza ed emergenza, come pure nella gestione del paziente con patologie croniche.

Infatti, sempre più frequentemente il ricorso al POCT viene invocato nella medicina primaria o per dare soluzioni a problemi legati alla gestione del paziente cronico che, per definizione, abbisogna del frequente monitoraggio di parametri di laboratorio per ottimizzare la terapia, prevenire le complicanze e migliorare la qualità di vita.

Principali riferimenti bibliografici

1) Sarkozi L, Simson E, Ramanathan L. The effects of total laboratori automation on the management of a clinical chemistry laboratory. Retrospective analysis of 36 years. Clin Chim Acta 2003; 329: 89-94.
2) Steindel SJ, Howanitz PJ. Physician satisfaction and emergency department laboratory test turnaround time. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 863-71.
3) Jahn UR, Van Aken H. Near-patient testing point-of-care or point of costs and convenience? Br J Anaesth 2003; 90: 425-7.
4) Stiell A, Forster AJ, Stiell IG, van Walraven C. Prevalence of information gaps in the emergency department and the effect on patient outcomes. CMAJ 2003; 169: 1023-8.

SESSIONE 2

ANALISI URGENTI: QUALI, QUANDO, COME, DOVE? IL "PUNTO" SUL POC (T)

Sala E

Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S2.2

THE POCT DIAGNOSTIC PROJECT ON THE MINOR ISLANDS

Scirè A.

Presidente Nazionale ANSPI

Introduction

An analysis carried out by the Ministry of Health, together with ANSPI (Associazione Nazionale Sanità Piccole Isole – National Health Association of the Minor Islands), on the assistance requirements on the Italian Minor Islands has highlighted how on the twenty islands examined, health difficulties affect 110,000 citizens, 0.18% of which are Italian (statistics refer to residents, therefore excluding the tourist flows).

Islands like Procida, Elba, Lipari, Ustica, Pantelleria, Ventotene, and the La Maddalena were examined where adequate emergency and hospitalisation services are lacking, not to mention the possibility of using heliambulances and hydroambulances, and the guarantee of a 24-hour assistance twelve months a year.

Health protection consequently represents one of the priorities for the Minor Islands, and the need to guarantee adequate health assistance is one of the major problems for the following reasons:

-dynamics of the population density
-absence of hospital structures;
-populations with a high ratio of elderly citizens;
-transport connection difficulties.

In the aim of providing satisfactory and effective answers to the demands of these populations, it is necessary to rationalise, strengthen and personalise the assistance modalities, by valorising human and instrumental resources present in the territory and overcoming situations of organisational, cultural, regulatory and professional rigidity.

In order to provide an upgrading of the assistance levels for the Minor Islands and the isolated mountain communities, specific interventions have been envisaged by the 2002 Financial Law.

Furthermore, the Agreement regarding the Definition of the Livelli Essenziali di Assistenza (LEA- Essential levels of assistance) between the Government, the Regions and the independent Provinces reached on 29 November 2001, identifies the Minor Islands and the mountain communities as among the special conditions requiring application of the LEA.

Due to its specific geo-morphological characteristics and the current status of the organisation of the health offer, the Eolian Archipelago is a prime candidate for the development of "modular" type projects that can also easily be adapted to the advantage of the other island situations as well, with opportune and limited custom-designed modifications for each individual case.

Telemedicine as a tool towards efficient health services

In every social context, the problems related to the distances and the promptness of interaction between the various actors of an activity system are coped with and reduced thanks to the information and telecommunications technologies (ICT). Within the medical/health field, this complex of technologies is called telemedicine.

Telemedicine is the elect instrument for conferring efficiency and efficacy to the network of the territorial health units, seeing that it is capable of providing the technological and professions supports necessary for ensuring qualified health services, while at the same time limiting the transferring of patients and operators. It is also the elect means for carrying out a screening function in the face of an excessive and unjustified request for urgent assistance.

Telemedicine for the Minor Islands

The assistance system of the disadvantaged Minor Islands and the mountain communities must form part of a socio-health network aimed at integration between prevention, and territorial and hospital assistance, and backed up by computerised and telemedicine systems. In this way it will be possible to ensure the coordination and continuity of health assistance and social services. Access and supply of the socio-health services will also be facilitated, costs cut, and monitoring of the patients and the services possible.

Proposed goals

The project's general goal is that of contributing towards improving the offer and quality of the health services supplied in the Islands making up the Eolian Archipelago, in line with the provisions of the Essential Assistance Levels via the development of telemedicine services.

Decentralised analyses: the POCT model for the Minor Islands

The performing of an analytical test in POCT must be capable to guaranteeing the same quality standards as those achieved today in a centralised laboratory.

This guarantee can only be ensured if all the known and tested procedures are adopted that are typical of the analysis laboratory quality systems, and performed by means of controls, safety, and quality.

For this purpose the telemedicine project for the Eolian Archipelago envisages the implementation of a POCT on every individual island, connected via a specific computerised network to the analysis laboratory of the Hospital of Lipari.

This analysis laboratory must carry out the role of "Supervisor" of the entire system.

The implementation of a POCT in the island framework must be capable of meeting the diagnostic demands necessary for managing chronic pathologies requiring ongoing monitoring (diabetes, coagulation decompensation) and any emergency/ urgent situations.

It is within this context that the diagnostic areas have been identified that will constitute the POCT of the Eolian Archipelago:

- Clinical chemistry
- Haematology
- Coagulation
- Cardiac markers
- Haemogas

During the current phase of the project, ANSPI, in concert with the local administrations, has been identified by the Ministry of Health as the body capable of guaranteeing the results expected from the project.

SESSIONE 2

ANALISI URGENTI: QUALI, QUANDO, COME, DOVE? IL "PUNTO" SUL POC (T)

Sala E

Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S2.3

CENTRALLY-MANAGED POCT: THE CAREGGI EXPERIENCE

Tronchin M.(1), Paniccia R.(2), Ognibene A.(1), Salti S.(1), Artioli S.(1), Giacobini A.(1), Targioni G.(1), Brogioni M.(1), Prisco D.(2), Abbate R.(2), Messeri G.(1)

Careggi University Hospital –Firenze (Italy)
(1) Central Laboratory for Biochemical Analysis
(2) Thrombosis Center

Careggi is the main Hospital in Tuscany and one of the largest in Italy; it hosts the Medical Faculty of the University of Firenze and it admits more than 85.000 patients/year. In 2003 the Laboratory Dept. performed more than 8.000.000 tests and 500.000 out of these were performed as Point of Care Testing (POCT). Such a relevant number of POCT, including blood-gas analysis, coagulation tests, glucose and cardiac markers, required the implementation of a centralized management of the activity and, most of all, of its quality. In this paper the results of this experience are reported, mostly regarding blood-gas (23 instruments) and coagulation (10 instruments). The process was driven by a POCT manager (POCTm) assisted by few analytical specialists (POCTas). When not already present in the ward, candidate new devices for POCT were introduced after a biphasic testing procedure. Phase I was carried on in the Central Laboratory and it was mostly devoted to harmonization with the in-lab instrumentation. In Phase II the device were installed in the ward. POCTm/POCTas took care of the ward staff training and provided them with brief written instructions. Major help came from connectivity, allowing the connection of most of the blood-gas analysers to a central workstation, placed in the Central Laboratory. By this PC, activity, reagent and calibration status, automated quality control (IQC) results of the instruments could be continuously remotely monitored and recorded. Due to the reluctance of the ward staff to perform internal QC (in most wards no QC was performed at all before the centralized management) automated procedures were installed whenever possible. Intranet managing allowed POCTm/POCTas to identify on average 3 problems/day. Sixty-six % of the cases required some central intervention: 18% of cases were resolved with remote intervention, 35% of cases were solved by the ward staff following lab guidance, and 14% only required a local intervention. In 3% of cases wards required central assistance in advance. As far as QC is regarded, central monitoring yielded 85% decrease of 1,3S Westgard Rule violation frequency. Imprecision (CV%) ranged from 4% to 7% in coagulation tests and from 2% to 200% in blood-gas analysis, depending on the analyte and its concentration. Finally, a major problem is the sample identification: few wards used to identify samples and even after central intervention some wards identified less than 20% of the samples analyzed.

S2.4

MANAGEMENT OF EMERGENCY TESTS ON A POINT OF CARE NETWORK IN HOSPITALS WITH TOTALLY OUTSOURCED LABORATORY

Dolci A., Barberis M.

Dipartimento di Patologia MultiMedica, Milano

Rationale: Point of care testing technologies (POC) are easy to use systems providing accurate and reliable results on low volume whole blood sample in extremely short turnaround time (TAT) not requiring any preanalytical step after blood draw. They represent a well established choice for emergency blood testing at the site of patient care delivery rather than in central laboratory.
Aim of the study: To describe the realization, analytical validation and 7 months results of POC network consisting of 8 POC sites for emergency assays. Methodology: MultiMedica is a private health group currently consisting of 3 hospitals, 2 outpatient clinics and a central, outsourced laboratory standing alone far from any hospital. To manage emergency tests in hospitals, we introduced 37 POC: 6 blood gas analyzers (AVL Omni9, BGA), 14 for coagulation tests (CoaguChek Pro DM; CGC), 3 blood cell counters (ABX Micros 60; ABX), 11 for cardiac markers (Cardiac Reader; CAR) and 3 for enzymes and metabolites (Reflotron Sprint; REF) on 8 different sites spread on 3 hospitals, as shown in following table:

SITES	BGA	CGC	ABX	CAR	REF
Emergency Room	1	4	1	2	2
Coronary Care Unit	1	2	-	2	-
Intensive Care Unit	1	2	-	1	-
Dialysis Dpt	1	-	-	-	-
Oncology Dpt	-	-	1	-	-
General for all Dpts	1	2	1	2	1
Coronary Care Unit	-	2	-	2	-
General for all Dpts	1	2	-	2	-

All POC were provided by Roche Italia, Milano. Before starting we checked POC validity by comparing their results to those obtained on laboratory analyzers, and we organized the QC program managed by laboratory remote to POC sites on computing network.
Results: All analytes checked for validity (electrolytes on BGA; glucose, creatinine, urea, bilirubin, AST, ALT, gGT, CK, pancreatic amylase; blood cell count; PT and APTT) showed acceptable correlations to laboratory analyzers. During 7 months of POC activity we performed 39168 tests (BGA: 18226, CGC: 3935, ABX: 5063, CAR: 2590, REF: 9355) and 6743 QC assays (BGA: 1345, CGC: 4710, ABX: 628, CAR: 15, REF: 45). We found some analytical problems only on bilirubin assay that sometimes gave unreliable results on the same sample. By QC program we monitored the analytical performances of all the POC and calculated imprecision and accuracy profile of any assay.
Conclusions: POC are validated, rapid and reliable assays to manage emergency tests in hospitals after laboratory outsourcing that greatly reducing TAT provides results which highly impact clinical decision and patient outcome.

SESSIONE 3

sessione internazionale - E-HEALTH TRENDS AND CHALLENGES

Sala G

Mercoledì 9 giugno, ore 10.15-12.45

S3.1

PERSONALIZED SERVICES IN E-HEALTH.
THE KNOWLEDGE MANAGEMENT CHALLENGE

Bonini P., Sanna A.

Scientific Institute H San Raffaele, Milano

The speakers will deliver to the audience the vision outlined by the European Commission R&D Integrated Project in e-health: PIPS – personalized information platform for health and life services, that aims at the delivery of real time, seamless services based on preventive and predictive medicine. This will improve current HC delivery models while creating possibilities for HC professional to get access to relevant-updated medical knowledge and European citizens to choose healthier lifestyles.
PIPS, using all the latest ICT devices (Mobile phones, PDAs, etc..), helps the individual supporting all the information needed at the point of decision (home, supermarket, restaurant, gym) in order to make conscious decisions and helping him/her to follow GP's therapeutical and nutritional instructions for maintaining a healthy lifestyle.
PIPS allows the HC professionals to have all the medical-scientific knowledge available for defining a "healthy plan" tailored for the patient that includes therapeutical treatment (if needed), nutrition guidelines and physical activity planning.

S3.2

PRIVACY AND CYBERSECURITY IN A CONNECTED WORLD

M. Wilkens (Ispra, VA)

Personalised services delivered via Information Society technologies would benefit both the service providers as well as end users if the added value is properly balanced with the trust that all actors have in these services.
The more so if these services are life-critical and directly affect personal security, for instance advise and actions in case of health crisis including epidemics or bioterrorism. Personalised services imply the processing of large amounts of personal data, even more when these services take account
of individual preferences and contexts which include objective data such as the location of the individual but also very subjective meta-data related to ethics, food habits, religion, etc. As such, these personal data become a critical asset for the success of these services. Their mismanagement on the other hand, could also be a showstopper. Already now, the phenomenon
of identity theft (i.e. presenting oneself as someone else to commit fraud or other crimes) is getting serious. Privacy of data needs to be managed in accountable and enforceable ways, taking into account balances between
individual preferences, personal security and public security. New opportunities are provided in the online world to make progress with new added value services
that are security and privacy compliant.

LETTURA PLENARIA 2

La Medicina Molecolare: attualità e prospettive

Sala C

Giovedì 10 giugno, ore 9.00-10.00

LP2

MOLECULAR MEDICINE: TODAY AND TOMORROW

Salvatore F.

CEINGE–Biotecnologie Avanzate and Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italy

Medicine has advanced tremendously in recent years thanks to: 1) research on the molecular and cellular basis of biological processes and their alterations in disease; 2) translational research that transfers laboratory data to the production of new drugs specifically aimed at a given molecular target; and 3) extraordinary developments in instrumental diagnostics, particularly imaging. Even greater advances may be expected when basic and applied research more effectively join forces with the physician. Within this framework, not only must we identify a "new way" of conveying the pathophysiologic information arising from post-genomic research, but the concept of "physician" should be modelled on the thought processes and practice of the emerging new philosophy of the molecular medicine.

Clinical molecular biology probes the genetic elements of our genome to ascertain its integrity and to identify disease-causing alterations. It promises to be one of the most fascinating fields of modern molecular medicine, but it must retain the characteristics of reliability typical of the clinical laboratory, and continue to quantitatively assess the risk of disease, thus providing fundamental data for evidence-based medicine.

Thus, molecular medicine extends and intersects with the advanced clinical laboratory as regards preventive medicine and diagnosis, monitoring of treatment, and gene and cellular therapy.

SESSIONE 4

TROMBOFILIE: DALLE MOLECOLE AL FENOTIPO

Sala C

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S4.1

MODULATION OF HEMOSTASIS: FUNCTIONAL POLYMORPHISMS, PREVENTION AND TREATMENT OF THROMBOSIS

Castaldi E.1, Marchetti G. 2, Bernardi F.2

1Department of Biochemistry, Maastricht University, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht, The Netherlands. 2Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Ferrara, Italy

The pathogenesis of thrombotic disorders recognises, besides environmental factors, clear genetic components.
Family-based study has estimated that more than 60% of the variation in susceptibility to thrombosis between individuals is attributable to genetic factors. Although numerous genetic risk factors for thrombosis have already been detected, a large fraction of all thrombophilic families are not accounted for by the known defects, suggesting the existence of additional genetic factors that contribute to thrombotic risk.
Investigations of the genetic bases of thrombosis have traditionally focused on the coagulation cascade and its regulatory pathways, which offer well-defined and easily measurable phenotypes amenable to the candidate-gene approach. In the last 50 years several genetically determined alterations in coagulation factors and their physiological inhibitors have been reported to contribute to the risk of venous and arterial thrombosis. These defects permanently shift the haemostatic balance in the procoagulant direction, a condition known as (familial) thrombophilia and associated with a life-long increased thrombotic risk. With respect to venous thrombosis, the first genetic defects to be recognised were quantitative and/or functional deficiencies of the natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S which represented a common finding in probands of thrombophilic families as well as in other affected family members. The deficiencies of the natural anticoagulants account only for a minor fraction of all cases of thrombosis.
More recently it was recognised that increased amounts or the "improved" function of procoagulant factors can also induce a thrombophilic state. This is the case for resistance to activated protein C, mainly due to the factor V Leiden mutation, and elevated levels of prothrombin associated with the PT 20210 G/A mutation. Other emerging hypercoagulable states, whose genetic bases have not been elucidated yet, are high plasma levels of coagulation factors VIII, IX, XI, lipoprotein(a) and possibly thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). Low plasma levels of TFPI could constitute a DVT risk factor. These abnormalities are relatively common in the general population and are found in a large proportion of thrombotic patients. Moreover, on account of their prevalence, they are likely to be co-inherited with either AT, PC or PS deficiency, leading to a significantly increased risk of thrombosis in carriers of double defects. Several examples of interaction between thrombophilic defects have indeed been described which i) provide an explanation for the variable clinical phenotype observed among carriers of the same abnormality, even within the same family; and ii) demonstrate that thrombosis is a complex genetic trait.
As for other multifactorial disorders, the susceptibility to thrombosis is the result of the complex interplay of several genetic and acquired/environmental factors, each contributing mildly or moderately to the overall risk.
Thrombotic susceptibility can be thought as a continuous variable, which shows a normal distribution in the general population: most individuals have an intermediate risk of thrombosis, whereas few have either a very low or a very high risk. An individual's susceptibility to thrombosis may vary over time due to variable exposure to acquired/ environmental risk factors. When susceptibility exceeds a certain threshold value, thrombosis occurs.
Identification of all (major) genetic determinants of thrombosis and full appreciation of their mechanisms of action will eventually make it possible to develop new strategies, and design selective drugs for the personalised prevention and treatment of thrombotic disorders, tailored to the specific characteristics and needs of each particular patient.

SESSIONE 4

TROMBOFILIE: DALLE MOLECOLE AL FENOTIPO

Sala C

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S4.2

SCANNING AND IDENTIFICATION OF MUTATIONS AND POLYMORPHISMS IN HUMAN FERRITIN GENES

Cremonesi L.1, Foglieni B.1, Ferrari F.1, Soriani N.1, Fermo I. 2, Cazzola M. 3, Levi S.4, Arosio P.5, Ferrari M. 1,6.

Unit of 1Genomics for Diagnosis of Human Pathologies, 2Separative Techniques, 4Proteomics of Iron Metabolism, IRCCS H. San Raffaele, and 6Diagnostica e Ricerca S. Raffaele SpA, Milan. 3Division of Hematology, University of Pavia Medical School, IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia. 5Dipartimento Materno Infantile e Tecnologie Biomediche, University of Brescia, Brescia.

Ferritin is made of two subunit types, H and L, which assemble in different proportion in a 24-mer protein. Two types of genetic disorders are associated with mutations of L ferritin gene, both with autosomic dominant transmission. One, named Hereditary Hyperferritinemia Cataract Syndrome (HHCS), is caused by mutations in the regulatory Iron Responsive Element (IRE) in the 5'UTR of the transcript that reduce binding affinity to the Iron Regulatory Proteins (IRPs) and lead to a constitutive up-regulation of the protein in tissue and serum. The second type of genetic disorder, named neuroferritinopathy, is associated with a frameshift mutation which alters the C terminus of the polypeptide. Only rare mutations have been reported for the H-ferritin 5'UTR, which do not seem to contribute to hyperferritinemia or iron overload. Aim of the study is to develop fast and automated approaches for both scanning of unknown sequence variations, and identification of known molecular defects in H and L ferritin genes. As scanning method, we set up DHPLC conditions and validated the system by extensive retrospective analysis, with complete concordance of results. Screening DNA samples from more than 800 subjects with high serum ferritin levels and 130 with neurodegenerative disorders led to the identification of 1 previously unreported mutation and 6 polymorphisms. We are also developing a diagnostic platform for HHCS by the use of the Nanogen Molecular Biology Workstation. About 30 mutations have been reported within the 30 bp of L-ferritin IRE structure of the gene, including deletions and conservative transversions. This represents a unique experimental model to evaluate the influence of different parameters such as probe design, labeling, presence or absence of stabilizers. Conditions to detect 23 mutations of L-ferritin IRE structure have been set up and validated. No cross-hybridization was found even for 4 mutations affecting the same nucleotide. This represents a first step towards the development of a diagnostic microchip for high-throughput analysis of genes involved in iron metabolism on large population samples.

Cremonesi L. et al., Br J Haematol. 2003,121: 173-9.

S4.3

PREVALENCE OF PROTHROMBIN G20210A MUTATION AMONG PATIENTS WITH CEREBRAL ISCHAEMIA

Stefanin C., Garghetti E., Cozzi M.G., Duca M.L., Rampinini F., Morelli B.

Laboratorio di Ematologia, Ospedale Civile di Legnano Legnano.

Background. The prothrombin G20210A mutation is an inheredited thrombofilic factor that is associated with an increased risk for venous and arterial thromboembolism. The prevalence of G20210A mutation is approximately 2,3% in general population (more frequent in southern Europe as compared to northern Europe and very rare in Asia and Africa), approximately 18% in young patients with venous thrombosis and approximately 6,2% in non selected patients. In arterial thrombosis the role of G20210A mutation is still unknown.
Aim of study. Evaluate the role of G20210A mutation in arterial thrombotic events (TIA, RIND, minor stroke, ictus). Patients and Methods. The study was performed on 200 patients (53 men and 147 women), median age 38 years (range 16-50), in addition to 350 healthy controls. All selected patients had cerebral ischaemia without any thrombotic risk factors, such as hypertension, diabetes, elevated levels of cholesterol and triglycerides, obesity, etc. The patients were hospitalized in the Neurology's Department of Legnano hospital. Cerebral ischaemia was confirmed on all patients by CT, MRI, angiography and EEG. Blood samples were collected in sodium citrate. Mutation has been tested using genomic DNA on whole blood, by PCR and sequency analysis. Results. In the group of patients we found 14 heterozigous individuals (7%; 95% CI, 3,5% - 10,5%): 4 men and 10 women, whereas in the group of controls we found 8 heterozigous individuals (2,2%; 95% CI, 0,6% - 3,7%): 2 men and 6 women. None of them was homozigous. The prevalence of factor II G20210A mutation is 7% among patients showing a significant difference versus group control (2,2%; p=0,006). The odd ratio shows an increase of relative risk during cerebral ischaemia of 3.2 fold associated with prothrombin mutation (95% CI, 1,3 - 7,7). Conclusion. Prevalence of prothrombin mutation (7%) in patients with cerebral ischaemia is comparable to the prevalence found in non selected patients having venous thrombotic events. Presence of this mutation is associated with an increased risk of arterial cerebral thrombosis.

References.
W. T. Longstreth, F. R. Rosendaal, et al. - Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A) - Stroke 1998, 29: 577-580.

SESSIONE 5

BIOCHIMICA CLINICA ED EMATOLOGIA DELL'ESERCIZIO FISICO

Sala E

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S5.1

LABORATORY APPROACH TO THE ATHLETES BIOCHEMICAL MONITORING

Alberto Dolci MD

Laboratory Department, MultiMedica, Milan Italy

During last years, biochemical monitoring of athletes during an elite season has been progressively grown and new, more sensitive and more efficient tests has been continuously introduced in laboratory practice to reach as early as possible the diagnostic goals well established in sports medicine: detection of sports anemia induced by iron depletion, evaluation of oxidative stress inducing imbalance between training and performance, early detection of overtraining and muscular fatigue. Any of this topic needs to be deeply discussed in terms of laboratory monitoring.

Iron depletion is a common risk for elite athletes and it is mainly due to a well known intravascular hemolysis induced by mechanical red blood cells breaking during physical exercise but also accelerated turnover of gastrointestinal tract cells and reduced iron supply play a critical role in iron depletion. It is mandatory to detect very early the decrease of iron pool to prevent sports anemia by means of laboratory testing. In addition to widely accepted markers of iron metabolism such as total and saturated iron binding capacity and ferritin, we routinely measure on athletes transferrin soluble receptor (sTfR), the earliest, reliable marker of iron biological availability. In fact its serum concentration increases very rapidly when activated erythropoiesis is not supported by the available iron because of a biological signal immediately induce the cleavage of sTfR from the transmembrane TfR and its release to the bloodstream. During a football professional season, on 876 players assayed for iron panel, sTfR has been predictive of iron depletion in 97 cases and always earlier than other markers.

Overtraining is a major risk for professional athletes reducing time-to-exhaustion in high-intensity endurance exercise. Many different biochemical markers has been studied to prevent this risk during an elite season. The most consolidated is Free Testosterone Cortisol Ratio (FTCR), that well correlates anabolic and catabolic hormones activity. To calculate FTCR it is mandatory to start from total testosterone and cortisol levels, now highly standardized and suitable on completely automated immunochemistry analyzers applying then a formula. On our athletes we confirmed the reliability of the cutoff for FTCR decrease at -30% to indicate short term over-reaching or incomplete recovery status from intensive training and/or residual weariness with reduced effectiveness for competitive purposes. On 1238 tests performed, the FTCR value never dropped below 0.35, a threshold value for overtraining syndrome. After the evaluation of 944 FTCR levels on football professional players, we defined at 0,50 the cutoff for evaluating the need to change training intensity to prevent overtraining syndrome, and at 0,65 the alert cutoff. The major problem of FTCR is the limitation of its use to male athletes. Salivary tests are now available for testosterone and cortisol determination as a promising tool for more frequent FTCR testing.

Oxidative stress is a balance between oxygen free radicals (FR) production and total antioxidant status (TAS) of the body. FR are generated by skeletal muscle during intense or prolonged exercise as a result of increase in oxygen uptake and mitochondrial consumption inducing lipid peroxidation. A growing amount of evidence indicates that FR play an important role as mediators of skeletal muscle damage and inflammation after strenuous exercise. Endogenous or dietary antioxidants play a protective role in this process by scavenging FR, and therefore they may prevent the damage effect. Different studies, actually, show that physical training results in increased activity of TAS and also that dietary supplementation with antioxidants has favourable effects on lipid peroxidation after exercise. We monitored the FR and TAS levels, in athletes of different sports to evaluate the clinical usefulness of those assays particularly in terms of modulating antioxidants supplementation and training intensity to prevent muscular injuries due to oxidative stress. On 1071 samples, FR concentrations ranged within 110-516 UCarr and 382/1071 (35.66%) samples show FR higher than the established cutoff (300 Ucarr). TAS levels ranged within 1.06-1.69 mmol/L and appeared under the cutoff (1.30 mmol/L) in 84/954 (8.80%) samples assayed. The same athletes repeatedly drawn along the same race or the whole season, show FR mainly stabilized around a specific level, probably reflecting the individual response to the oxidative stress without significant modifications due to the physical exercise in well trained athletes. In this way any significant increase of FR concentration should be carefully evaluated possibly indicating a biochemical modification of the oxidative/antioxidative balance of the athlete toward an oxidative stress. However, FR concentrations are clearly affected by age and gender of the athletes. The elderly is a major factor inducing the oxidative stress, as largely described for general population, while black gender show higher FR levels than caucasians. TAS levels appear distributed in a very narrow range with a persistence during the monitoring time similar to that shown by FR. Correlation between FR and TAS seems to confirm the ability of antioxidants in limiting FR generation. Our data indicate that FR and TAS determinations may play an important role in monitoring oxidative stress being able to identify athletes candidates for antioxidants supplementation.

Muscular fatigue is efficiently monitored by total creatine kinase (CK) activity determination during recovery after races or heavy training carried out to assess the complete CK clearance before restart with high-intensity exercise. CK is really useful to define the different ability of the same sport team athletes to recover muscular stress and then to differentiate the training program especially during competition with short recovery time. We commonly measure CK on field by Point of Care systems.

SESSIONE 5

BIOCHIMICA CLINICA ED EMATOLOGIA DELL'ESERCIZIO FISICO

Sala E

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S5.2

VARIATION OF HEMATOLOGICAL INDEXES IN PHYSICAL EXERCISE

Lippi G.

Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico, Verona

Physical exercise induces a wide series of biochemical, endocrinological and metabolic adaptations that positively influence the individual state of health. Conversely, physical inactivity is nowadays universally recognized as a major risk factor for the development of cancer and cardiovascular disorders.

The biochemical adaptations following a regular, moderate to intense, aerobic physical activity give rise to some issues in laboratory medicine, especially in the field of laboratory hematology. In fact, the complex and plastic variation of the blood and the cardiovascular system are reflected by the generation of a population of hematological and biochemical parameters that might differentiate athletes form sedentary individuals, creating distinctive subpopulations of individuals, displaying unique biochemical features. These evident discrepancies should be accurately recognized as they might become the source of several problems of standardization, as they might hamper the definition of specific reference ranges with substantial repercussion in the identification of states of pathology in athletes and in the interpretation of results of antidoping controls.

The identification of population-specific reference ranges for hematological and biochemical parameters in athletes is rather difficult as it should consider (1) anthropometric differences, such as sex and age, (2) heterogeneity in quality (sport discipline, aerobic or anaerobic exercise) and amount (seasonality, periodization) of the physical workload and (3) analytical techniques and instrumentation that should be suitable for this target (quality, reproducibility and accuracy of results, speed, easy availability during major sport competitions). Additionally, the analytical techniques employed to test athletes should be unequivocally free from analytical problems that might give rise to doubtless or equivocal interpretation in the context of antidoping controls. Finally, it is necessary to recognize and report each preanalytical and analytical feature that might contribute to sum additional sources of variation in results of laboratory testing, such as problems in sample collection (difficulties to locate easy venous accesses, deposals for blood collection, haemolysis, lipaemia), the site of specimens collection (hospital or private laboratory, competition fields, training camps), the context (before, during, after of far from the competitions), the physical state of the athlete (altitude, training regimen), the Institution officially responsible for collection, transport and processing of the samples and the aims (normal routinary check-up, official periodical testing prescribed by the various Sport Federations, antidoping controls).

S5.3

RETICULOCYTES AND "NEW" HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN PHYSICAL EXERCISE

d'Onofrio G.

Servizio di Emotrasfusione, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy

The assessment of hematopoietic function in subjects undergoing regular, strenuous and/or competitive physical activities is a basic aspect of sport medicine. It permits to disclose risk conditions and prevent the development of complications in athlets with anemia or abnormaties of red cells, leukocytes or platelet. It also ensure the mainteinance of a steady condition of health in subjects submitted to extreme training and competition physical stress. Finally, it is very important for the detection of blood doping. The hematological evaluation is based on the results of a limited number of laboratory tests. Laboratory data in sport medicine, such as in other medical areas, do not have value in themselves. They must be subjected to the transformation process known as interpretation. This can be done through two methods: transversal evaluation and longitudinal evaluation. In transversal evaluation, data is compared with that of a reference population or a threshold value, and adjudged to be normal or abnormal. Examples of this type of evaluation include the 1990s' UCI use of hematocrit cut-off values and FIS use of hemoglobin cut-off values. Longitudinal evaluation involves the comparison of data with earlier data from the same individual and is defined as changed or not changed. This evaluation method is probably much more effective than transversal evaluation, and is the basis for the so-called hematologic passport strategy, which is heralded by many scientists and some sport federations.

The blood count is the cornerstone of the hematologic evaluation. At present it is carried out using precise and accurate hematology analyzers, which reduce to very low level analytical variability. For the assessment of red cell production, hemoglobin concentration is the most precise, accurate, standardized and harmonized hematology parameter. It expresses more directly the oxygen-carrying capacity of the blood and is obtained by photometric measurement after conversion to cyanmethemoglobin, supported by a unique hemoglobincyanide reference preparation proposed by the International Council for Standardization in Hematology (ICSH) and by an established reference method, which was proposed and accepted by the ICSH in 1987. Hematocrit values, on the other hand, measured by automated methods, in which the basic object of the direct measurement is the electrical impulse generated by the cell, is calculated from pulse size and red cell count and is not the best parameter for red cell quantitative assessment, more difficult to standardize. Thus, especially for blood doping detection and screening, hemoglobin is the preferred relevant measurement to rely upon. Hematocrit is a less precise duplicate or surrogate.

In the year 2000s' blood cell count several new parameters can be used for hematologic assessment of athletes. Some of them are uniquely provided by one or few methods, while others

SESSIONE 5

BIOCHIMICA CLINICA ED EMATOLOGIA DELL'ESERCIZIO FISICO

Sala E

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S5.3

show little interinstrument comparability. The RDW, an indicator of the level of heterogeneity of red cell size has not been extensively studied. HDW and red cell subpopulations have been studied with the only hematologic analyzer that provides them. Additional useful hematological parameters are obtained from the flow cytometric measurement of reticulocytes and their properties. Both absolute reticulocyte and percent reticulocytes are very useful parameters, which, while always standardized, have some measurement problems at very low volumes. Reference values for reticulocyte measurements are somewhat heterogenous, and change from one analyzer to the next. Different methods of measuring the immature reticulocyte fraction, in particular, have been shown to have very poor inter-method correlation. However, reticulocyte volume measurements obtained using different methods are well correlated.

Anemia in athletes is frequently mild and spurious, false, in athletes who are aerobically fit: hemoglobin level is slightly reduced, especially in endurance sports, because aerobic exercise expands plasma volume more than red cell volume. It is a dilutional pseudoanemia due to a renin-aldosterone-vasopressin response to vigorous exercise. Iron deficiency and iron deficiency anemia, however, are not rare, especially in some sports and in female athletes. It was recently shown that iron deficiency without anemia impairs adaption to aerobic exercise, and that iron supplementation improves endurance after training (Hinton et al, 2000). Assessment of iron balance is thus of fundamental importance: serum ferritin is the main parameter which correlates with iron stores, while percentage of transferrin saturation is a direct measure of the iron availability for erythropoiesis. Hyperferritinemia, on the other hand, is extremely common in some sports, such as cyclism, owing to diffuse illogic intravenous iron self-administration.

Exertional hemolysis is due to intravascular red cell damage due to the impact of footstrikes or other body parts, such as in rowing (Telford et al, 2003). It is rarely a cause of anemia, since iron is recycled in new red cells, but can be associated with mild macrocytosis. Serum haptoglobin can be low. No consistent data are available about the impact of exertional hemolysis on reticulocytes and reticulocyte parameters (with important implications for blood doping detection), RDW and red cell morphology. Monitoring of hematological parameters over time, including iron metabolism at least in female athletes, is very useful to detect changes due to disease, fatigue or blood boosting. The measurement of serum EPO in athletes is especially useful for detection of EPO doping, such as that of serum soluble transferrin receptor. Detection of allogenic blood transfusion for doping purposes can now be obtained using extensive red cells antigen phenotyping, while autologous transfusion is at present impossible to demonstrate.

In conclusion, hematology laboratories at the start of the new century are provided with a growing number of parameters and methods aimed at assessing the degree and efficiency of erythropoiesis, some of which have been shown to be more accurate or useful than others.

Convertino VA, Brock PJ, Keil LC, Bernauer EM, Greenleaf JE. Exercise training-induced hypervolemia: role of plasma albumin, renin, and
vasopressin. J Appl Physiol 1980, 48:665-669.

d'Onofrio G, Zini G. Addendum to strategies to deter blood doping in sports. Haematologica. 2002,87:ELT31

d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, Caenaro G, Tommasi M, Micciulli G. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. Blood 1995, 85:818-823.

Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG.
Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. Haematologica. 2003, 88:333-344.

Hinton PS, Giordano C, Brownliem T, Haas JD. Iron supplementation impoves endurance ager training in iron-depleted non-anemic women. J Appl Physiol 2000, 88:1103-1111.

Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. Haematologica 2003, 88:570-581.

Nelson M, Popp H, Sharpe K, Ashenden M. Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. Haematologica 2003, 88:1284-1295.

Schumacher YO, Grathwohl D, Barturen JM, Wollenweber M, Heinrich L, Schmid A, Huber G, Keul J Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists. Are the control values for blood testing valid? Int J Sports Med 2000, 21:380-385.

Telford RD, Sly GJ, Hahn AG, Cunningham RB, Bryant C, Smith JA.
Footstrike is the major cause of hemolysis during running. J Appl Physiol. 2003, 94:38-42.

Weight LM, Klein M, Noakes TD, Jacobs P. 'Sports anemia'—a real or apparent phenomenon in endurance-trained athletes? Int J Sports Med. 1992,13:344-3472-.

SESSIONE 5

BIOCHIMICA CLINICA ED EMATOLOGIA DELL'ESERCIZIO FISICO

Sala E

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S5.4

PHYSICAL EXERCISE AND THE BIOCHEMICAL LABORATORY ANALYSES OF HORMONES

E.F. De Palo1, E.Cappellin1,2, B. Zecchin1, G. Antonelli1, P. Spinella3, Chiappin S.1, Gatti R.1.

1 Sez. di Biochimica Clinica, Dipt. Scienze Medico Diagnostiche e T. S. – Università di Padova.
2 USL n.15 – Camposanpiero (Padova).
3 Dipt. Medicina Clinica e Sper. – Università di Padova.

Physical exercise greatly affects the hormonal system given that energy fuel supply availability and distribution are crucial in this physiological condition of the body. Hormones affect and are affected in relation to the intensity, duration and type of exercise. The training state is another very important aspect involved in the endocrine arrangement. The biochemical analyses of the hormones concern the suitable assays of the hormones in se and also of their related molecules, namely hormone precursors and fragments/catabolites, and other compounds that are affected by hormone actions. Furthermore the environment and the nutritional state are among the other potential factors affecting the endocrine system. Other factors to be taken into account are age, lifestyle, the time of the day and also body posture and stress effects.

The biochemical measurements, carried out in a laboratory, specifically devoted to analysing the biochemical endocrine condition of the individual, usually require apposite knowledge of the subject to enable a suitable reading of the laboratory values. Habitually the reference ranges are the same used for the patients and the clinical application and, in this case, only well defined aspects are taken into account, when strictly required, such as age, sex and time of the day. The physical exercise effect and/or the training state are never reported, although, the hormones affected by physical exercise are numerous and other stimuli must also be taken into account when the hormones are under investigation. These factors, apparently distinct, are in reality frequently coupled with physical exercise; for example, catecholamine levels are affected by hypoxia, hypo and hyperthermia, hypovolemia and stress; cortisol concentration is influenced by hypoglicemia, hypothermia, hyperthermia, dehydration, hypovolemia; volemia and hypoxia stimulates atrial natriuretic factors; psychological stress also affects hormones.

Extension and complexity of the endocrine system determine the copiousness of the hormones that should be investigated for a complete and exhaustive description of the hormones influenced by physical activity.

A possible simplification could be obtained by analysing groups of hormones specifically related to well defined and established aspects. The clinical biochemical laboratory is mainly devoted to diagnosis and clinical applications, therefore the reference ranges and the analysis methods are chosen with this aim. In the light of this aspect the question is: can the athletes and the individuals, requiring biochemical analyses, be studied with the same objective as a patient is studied? The aim of the biochemical analyses carried out on an athlete is to verify his/her health and mainly (particularly when he/she is involved in sport at a high level) the condition related to the physical performance and to know the training state, the fatigue and energy performance strength. In effect he/she should be a healthy individual who is examined for the ideal body hormonal condition for her/his better performance. Instead the traditional clinical biochemistry analyses aim to define and study a clinical state and the investigation is to recognise or follow up a pathology. Furthermore when an athlete is under examination the condition for specimen collection is the steady state, the time of the day and, sometimes, his/her body posture. Instead the training state and how many hours/days passed from the last performance/training session and how long it was and if "to exhaustion". When an athlete arrives in the lab for the specimen collection perhaps he/she is "erroneously" considered at rest. Moreover the investigated individuals, compared with the subjects defining the reference ranges, are usually young and in a strict age interval, therefore also this aspect diminishes the appropriateness of the measurements.

In addition the sport biochemistry laboratory should consider the body fluid distribution, in fact physical exercise affects plasma volumes and this phenomenon has been observed not only in an acute condition but also in relation to the training; the well trained athlete has increased blood volume (4.7 vs 6.0 ml). The post exercise proteinuria is another well known aspect and it must be taken into account when urine analyses are carried out.

These general aspects would drive the biochemical laboratory to distinguish and appropriately indicate the ranges and significance of the analytical values. The final aim is that a sports biochemistry laboratory is involved and not a clinical biochemistry laboratory.

SESSIONE 5

BIOCHIMICA CLINICA ED EMATOLOGIA DELL'ESERCIZIO FISICO

Sala E

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S5.5

DOPING/ANTIDOPING : TOPICAL QUESTION AND FUTURE PROSPECTS

D'Ottavio D.

Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma

Doping it's now a phenomenon so widespread in our society to begin a real public welfare problem.
As a matter of fact represents the first link of the chain: integrators – medicines - prohibited medicines for doping – drug addiction.
With the consequences that all people knows: organic damages, invalidity, death.
It's a big and burning problem, and the actual used practices aren't effective to oppose this phenomenon.
In fact, the very little percentage of positivity found in classical antidoping controls (less than 1%), isn't representative in connection with all prohibited medicine for doping, sequestrated by judicial authorities.
High costs of controls, impossibility to detect some substances, difficulty to programme "surprise controls", represents real limit to the actual used method.
Likewise, doping phenomenon it's a problem that regard health of all people and not only athlete.
Almost all antidoping controls are addressed to champions (for economic reasons), neglecting young people that made sports.
We propose to deal this problem in a different way to consider effective and economicity.
Clinical Biochemistry is a big help useful to evidence before, severe disease, and blood or urine alterations bound to doping practice.
At least are represented protocols of clinical chemistry tests to do, in relation with class of forbidden substances by 376/2000 law, as well as damage bound with use of those substances.
Alterations of this parameters isn't necessary involved with hiring of this substances, because of, isn't utilisable for judicial use, but might used to evaluate health of athlete.
To control this parameters during years of "athletic live" is a way to work for protection of fellow who practice sports at any level.
When athlete has alteration respect own normal value, it necessary to stop sport activity until, physiological conditions are restored.
This model easy to use and chip can represent a way to work against doping phenomenon and its effects.
The keyword of this problem are "prevention and control" to allow check all athlete at any level whether professionals or amateurs.

S5.6

EVALUATION OF HORMONAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN COMPETITIVE ATHLETES AT REST AND DURING SPORTS ACTIVITY

D.Faggian*, C.Fiore°, D.Armanini°, R.Baron°, M.Plebani*.
*Department of Laboratory Medicine, University of Padua

°Department of Medical and Surgical Sciences – Endocrinology, University of Padua

Recently, the assay of hormonal and biochemical parameters in competitive athletes has become undeniably newsworthy and vitally important since the sports world often considers substance-induced modifications that improve performance, to be good. There is little or no consideration given to the fact that these modifications can have negative effects on an athlete's health, since only in few cases has it been possible to demonstrate early concomitant organic damage.
The aim of the present study was to evaluate possible modifications of biological parameters, which are subdivided into various classes, choosing the most representative of each class:
-blood parameters: hematocrit, hemoglobin, red cells;
-metabolic parameters: sideremia, ferritin, glycemia, uricemia, ãGT, creatinine, CPK, cholesterol, triglycerides, urine exam;
-electrolyte parameters: sodium, potassium;
-hormonal parameters: plasma testosterone, GH, IGF-1 and urinary nandrolone metabolites.
Blood and urine samples of 9 males athletes of a cycling team (age range 19-22 years old) were collected at different phases of their agonistic activity:
1.at the beginning of their preparation
2.during the period of maximum workload stress, "overtraining"
3.in two moments of the competitive season.
The results highlighted a significant reduction in all hemocytometric parameters, and the modifications became more and more evident as the season progresses.
The only metabolic parameter that showed significant modification was glycemia, which was increased during the period of maximum workload stress and later gradually dropped over the course of the season.
Serum electrolytes were unchanged in all the measurements.
Among the hormone values tested, only IGF-1 was significantly reduced in the period of maximum training.
In conclusion, a complete testing, using various parameters that can be assayed simultaneously from the same blood sample, is a better measure not just to examine the state of health of an athlete, but also to suspect possible illicit use of doping agents, especially when the substance cannot be directly assayed.

SESSIONE 5

BIOCHIMICA CLINICA ED EMATOLOGIA DELL'ESERCIZIO FISICO

Sala E

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S5.7

CPK ISOFORMS IN EVALUATION OF MUSCULAR STRESS DURING MAXIMAL ERGOMETRIC TEST (MET)

Tamaro G., Parco S., Ciacchi E., Tonini G., Gombacci A.

IRCCS Burlo Garofolo - Trieste

Isoenzyme and isoform of CPK are commonly used in clinical practice not only in cardiovascular disease but also in chronic muscular disease.Aim of the study is the evaluation of muscular and cardiac damage in some chronic diseases involving muscular and cardiac metabolism enhancing the turnover, in order to study muscular and cardiac stress by MET.We enrolled in our Institute during the last four years 65 adolescents, age 6-17ys, 41 males, 24 females, affected by diabetes type 1(18), GH deficiency in therapy (21), obesity (26), all practising scholastic physical activity and in which this activity is therapeutic and is advised by physicians.MET was performed by cicloergometer, with steps of 25 watts every 2', till exaution, monitoring EKG and blood pressure. CPK isoenzymes and isoforms were dosed by electrophoretic separation by REP Helena.In order to ratio MM3/MM1, it was found pathological (>0.5) in 19 cases; in 12 cases MB2/MB1 ratio was >1.5 and in 10 cases both ratios were pathological.As described in literature, insulin and GH are anabolic hormones and their therapeutic use may give the result of increasing MM3/MM1 (muscular) and /or MB2/MB1 (cardiac) ratio; in obesity the mechanism is not clear.Anyway the MET may represent an useful tool combined with the study of the CPK metabolism for a complete evaluation of our patients to guide towards a correct physical activity.

Apple F.S., Hellsten Y., Clarkson P.M.: Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. Clin. Chem. 1988:34, 1102-04

SESSIONE 6

IL CQI IN LABORATORIO, PASSAGGIO OBBLIGATO PER LA QUALITÀ DELL'INFORMAZIONE

Sala G

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S6.1

QUALITY CONTROL MANAGEMENT IN A STAT LABORATORY

Giacomin C., Marigo B., Raho M., Schiavon E.

Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

The internal and external Quality Control (QC) schemes in stat laboratories are usually very similar to programs applied in routine laboratories. Since no specific rules have been defined for urgent tests, we can assume that the principles used in QC management are identical in this field. However, "urgency scenario" has features that should be constantly borne in mind. Because this topic has not been well defined, in the present study we report on a QC organization based on an 18?year experience from a large stat laboratory serving 1,800 beds in a university-hospital with emergency (care units?) rooms, an organ and cell transplantation centre, intensive and coronary care units. The most significant aspects that guided our choices are listed.

·The principles and evaluation criteria used in routine testing must be applied to the stat laboratory. This means that no compromise between analytical quality and quickness of results can be accepted.

·In an emergency setting, the analytical series ideally consists of every single sample. So the traditional use of QC test as confirmation at the end of a series is not applicable, and a confirmatory role should be formulated in advance. This allows the immediate release of test results.

·The frequency of the measurements over a 24?hours depends on a balance between the stability of the method or instrument and the cost of materials, reagents and labour. A useful method to determine the best possible timing for QC is based on the practical frequency and impact of non?valid result that invalidates previously reported results. This condition can be reduced to the minimum.

·The time of day when QCs can be performed takes in account the concentration of the activity and, on the other hand, the risk of slowing down in the analytical process introducing further tests. For most analytes we prefer a midday timing if methods are stable and so performed once a day (e.g. blood?gas), and early morning (about 6.00) and afternoon for critical analytes (e.g. sodium and hemoglobin). This choice is not based on operators' shifts.

The recent consolidation processes produce a new decisional situation with several methods and QC results that must be validated simultaneously. This type of situation can compromise laboratory efficiency and requires new instruments for the quick break of a single channel or test and a subsequent prompt recovery of samples suspended.

We also present some examples of the daily management of internal QC.

S6.2

PROTHROMBIN TIME:
INTERNAL QUALITY CONTROL AND ALIGNMENT OF TWO INSTRUMENTS

Ferrarese S., Bettin C., Fredella F., Menichini F., Padoan A.M.

Lab. Analisi Ospedale Umberto I – Venezia Mestre

The coagulative tests and in particular the INR test, are some of the most critical of the laboratory analysis.

We think that correct identification of the coagulative state of the patient is the necessary condition for the best diagnostic and therapeutical state and it is also the basis to carry out the appropriate preventive treatment.

Object: defining the operative modalities flux to realize an efficient analytic process using two equal and interchangeable instruments (located in two different places of the laboratory). This process must always keep under control the reagents stability, the technical staff manual dexterity and the instruments efficiency to grant the precision of the results and the consequent correct information to the clinician.

The coupled utilization of CQI and a pool of plasma is a good instrument for monitoring the precision of the analytic systems concerning the coagulation.

While CQI is essential for testing the precision of the systems, the blood plasma mixture (pool) is used for the alignment of the instrumental response.

We use two STA-R (Roche Diagnostics) instruments, which have been projected for tests in vitro for the diagnosis of the pathologies that influence on hemostasis. Using these instruments it is possible to realize chronometrical, colorimeters, and immunological tests, based on blood plasma specimen.

Metodology: our method is based on the utilization of CQI and pool, tested everyday on the instruments. CQI is used only when there is a new reagent is introduced in the analytic session.

The values must be in the range obteined by the blood plasma mixture (pool) and the CQI producer.

At any change of the lot number, the pool is used for the alignment of the new reagent on the used one, and for the alignment of the two instruments, thanks to a series of exams carried out on both the test-meters before their use.

In this way it is possible to obtain the necessary data where the "t" Student test can be applied, for valuing the discovered differences.

Conclusion: the alignment is reached when:

Calculated "t" < theoretic "t" for "p"=5%

SESSIONE 6

IL CQI IN LABORATORIO, PASSAGGIO OBBLIGATO PER LA QUALITÀ DELL'INFORMAZIONE

Sala G

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S6.3

THE CQI AND THE BIOLOGICAL VARIABILITY: SOME PRACTICAL APPLICATIONS IN EXCEL PLATFORM.

Romano C.*, Angelini G#., Vanni C.*

* Laboratorio Analisi SS Annunziata Chieti
# Laboratorio Analisi S. Liberatore Atri (TE)

The CQI is an essential element for the corrected management of the analytic phase and has a central role and its interest is always growing in the last period. The main scope of CQI is to verify the performances of the analytical systems through the appraisal of indices such imprecision, inaccuracy and total error whose limits of acceptability can be defined according to several criteria (state of art, interval of reference, opinion of the clinicians or experts, biological variability (VB)). Our interest has been oriented on criteria based on the intra (CVw) and interindividual (CVg) biological variability.
A crucial point of the CQI is its activation; therefore the knowledge of the acceptability limits (analytical goals) is essential for a corrected management.
The first and more important point suggested from experts of management of the CQI, is the definition of the analytical goals (TA) (e.g. normalized OPSpec chart proposed by Westgard that are based on the acceptable Total Error [Eta]).
The rules for the definition of the analytical goals based on the biological variability (VB) are well enstablished so far (Fraser, Ricos, Franzini and others) and are independent from the analytical systems, because the rules are linked to the knowledge of the biological variability.
The rules can have three goals: optimal, desirable and minimal.
In our study we have considered the desirable goal and we have applied the following formulas:
I% (imprecision) = 0,5 CVw
B% (inaccuracy/bias) = 0,25 (CVw2 + CVg2)1/2
TE% (total error) = k 0,5 CVw+ 0.25(CVw2 + CVg2)1/2
with p=0.05 k = 1,65
In our laboratory, some procedures based on the VB for the management of the CQI have been elaborated using an Excel platform that, clearly, do not replace the Biorad's procedures (Biorad is our provider of control material specialized in the management of CQI and CQA) but they give an additional value to the entire process.
The elaborates, focusing on the VB rules, supply graphical analysis of the three chemistry dry analyzers (Vitros) and of the two analyzers for the cardiac marker dosage (Dimension). The analysis and the appraisal of the data is made either for a single analyzer (imprecisione, bias and total error) or among analyzers.
Moreover, we show monthly and annual summarizing prospects of the analytic performances.
In particular, for the Dimension analyzers, we have elaborated a procedure that compares the analytical goals based on the VB goals with those proposed from the provider of the quality control program.
It is interesting to analyse data from the two different points of view in order to define, once more, clear rules for the choice of the analytical goals.
As a matter of fact, for some test the choice of analytical goals bases on VB is too restricted, on the other hand we notice that the usage of the analytical goals based on the value according to suppliers' conditions is always too wide and analytic system pending. Finally, we will describe some cases from our laboratory, in which the lack of analytical goals forces us to a defective interpretation of the data.
Goal of our presentation is to emphasize the need of a more qualitative attention towards the CQI, whether it plays an essential role in implementing the overall Quality Sistem of laboratory processes.

SESSIONE 6

IL CQI IN LABORATORIO, PASSAGGIO OBBLIGATO PER LA QUALITÀ DELL'INFORMAZIONE

Sala G

Giovedì 10 giugno, ore 10.15-12.45

S6.4

THE REPRODUCIBILITY OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS BETWEEN TWO DIFFERENT AUTOMATED ANALYZERS

Bertoli I., Spaccavento M.

Laboratorio Analisi Ospedale Civile, Campo SS.Giovanni e Paolo, Venezia

Background. To understand the importance to have a method of control for evaluating the reproducibility of data obtained using 2 different hematological analyzers with different analytic technology, is important to remember that the Internal Quality Control is fundamental to ensure the efficiency of the analyzers, however, does not assure the reproducibility of data obtained from different instruments. The purpose of this study was to evaluate which shiftings between repeated results evaluated are acceptable. The instruments used for the evaluation were the: Advia 120 (Laser-based system) and Sysmex 4500 (Direct current detection system).
Methods. The classic method of repeated analysis within a series was used and the difference rate obtained from the two analyzers was calculated. For a three months time interval (80 samples), a normal and pathological samples were evaluated on both the Advia 120 and Sysmex 4500. The rate percentage between the differences of the results obtained in duplicate was applied for the following parameters: WBC, RBC, HBG, HCT, PLT. We estimated the results on the basis of the precision within a single series and for different series and we prepared a control table with the respective control limits (presently in use).
Results. The three months correlation study confronting the results obtained between Advia 120 and Sysmex 4500 was excellent (r >0.98), in both the normal and patholocical range of data. The control limits obtained with this study are daily used to evaluate and to contain the possible variations finding between results performed from different analyzers.
Conclusion. The correlation between two different automated hematological analyzers is the best way to guarantee an excellent reproducibility of data, furthermore it allows to control that the inevitable variances of results are not significant from the analytical and clinical point of view.
Bibliographic references.
1.C.Franzini. Attendibilità analitica in biochimica clinica. Biochimica Clinica. 1992; 269-286.
2.Sysmex Journal International Vol.5 No.2, 1995 114-125

S6.5

PLANNING OF INTERNAL QUALITY CONTROL PROCEDURES: OUR EXPERIENCE ON APPLICATION OF ANALYTICAL GOALS

Callà C.; Colacicco L.; Forni F.; Giardina G.; Gozzo M.L.

Biochemistry and Clinical Chemistry Institut, Università Cattolica del S. Cuore , Rome, Italy.

The appropriate internal quality control procedure (IQC) for each test is carefully selected on the basis of the quality required and of the precision and accuracy observed for the method. The procedure should minimize false - rejection and maximize error - detection by selecting the appropriate control rules and the number of control measurements. The Westgard computerized program "QC Validator" was used in order to optimize the quality control procedures for all the parameters analyzed with the Hitachi 917 (Roche). The reproducibility and the trueness of each method were the outcome of the cumulative elaboration of IQC results for the last two years, and of the bias estimated from EQA program of the Centre of Biomedical Research (CRB), respectively. The analytical goals were calculaded on the basis of Biological Variability data according to Fuentes (1).

TEST	T.E	$T.E._a$ (Fuentes)			CONTROL PROCEDURE	
ALT	10	15.4	30.7	46.1	$1_{2.5s}$	N=4
ALB	4	1.8	3.6	5.4	$1_{2.5s}$	N=3
AML	7	7	14	21	$1_{2.5s}$	N=4
AST	10	7	14	21.1	$1_{2.5s}$	N=4
DBil	15	22.1	44.1	66.2	$1_{2.5s}$	N=4
TBil	15	15.1	30.1	45.2	$1_{2.5s}$	N=3
CA++	5	1.1	2.1	3.2	$1_{2.5s}$	N=6
Cl	3	0.6	1.5	2.3	$1_{2.5s}$	N=6
CHOL	5	4.2	8.4	12.6	$1_{2.5s}$	N=4
PCHE	6	4.6	9.1	13.7	$1_{2.5s}$	N=4
CK	10	18.7	37.5	56.2	$1_{2.5s}$	N=4
CREA	6	3.2	6.4	9.5	$1_{2.5s}$	N=4
Fe ++	10	15.4	30.8	46.2	$1_{2.5s}$	N=4
ALKP	10	5.3	10.6	16	$1_{2.5s}$	N=4
Pi	9	4.8	9.7	14.5	$1_{2.5s}$	N=4
GLUC	7	3.8	7.5	11.3	$1_{2.5s}$	N=4
γgt	10	10.4	20.8	31.1	$1_{2.5s}$	N=4
LAD	8	16.4	32.9	49.3	$1_{2.5s}$	N=4
Mg	8	14.7	29.3	44	$1_{2.5s}$	N=4
K+	7	8.8	17.5	26.3	$1_{2.5s}$	N=4
TP	4	1.8	3.5	5.3	$1_{2.5s}$	N=4
Na+	2.5	0.4	0.7	1.1	$1_{2.5s}$	N=6
TGL	8	15.5	31	46.5	$1_{2.5s}$	N=4
URCA	8	5.5	11.1	16.6	$1_{2.5s}$	N=4
BUN	7	7.4	14.8	22.2	$1_{2.5s}$	N=4

Our reported TE are in general, broader than those really obtained. We think that the efforts required to maintain the highest analitycal quality level are not always justified by the patient's clinical outcome.
1) Sebastian-Gambaro M.A, Liron-Hernandez F.J, Fuentes-Arderiu X,Eur.J.Clin.Chem.Biochem 1997,35:845-

LETTURA PLENARIA 3

L'encefalopatia spongiforme

Sala C

Venerdì 11 giugno, ore 9.00-10.00

LP3

TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES

Pocchiari M.

Laboratorio di virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases are fatal neurological disorders of humans and some other animal species. TSE diseases are transmissible by injection (through many different routes) or ingestion of infected tissues. Disease develops years or decades after infection: during the incubation period the infected host shows no clinical signs and no laboratory tests are available for the identification of infected patients. It is therefore difficult to predict how many people harbour the TSE agent, and this is of special concern in the UK and elsewhere in Europe where an unknown number of people is likely incubating variant Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) resulting from the ingestion of BSE-infected food. The recent report of the occurrence of variant CJD in a patient after he received a transfusion of red blood cells from an apparently healthy donor who developed disease 3.5 years after blood donation is of great concern for the safety of blood and blood-derived products. Lack of pre-clinical diagnostic tools in TSE diseases is basically due to the difficulty to measure the only available marker of disease, PrP^{res}, in blood or cerebrospinal fluid. PrP^{res} is a pathological conformer of the cellular prion protein (PrP^{c}) and can be distinguished from its normal precursor because of its detergent insolubility and partially resistance to proteolytic treatments. After infection, PrP^{res} accumulates in the CNS, and at less extent in other tissues of the host, even before the appearance of clinical signs of disease. Although PrP^{res} can be detected in relatively easy accessible tissues such as the olfactory mucosa or in variant CJD also tonsils, it is impractical and unethical to use surgical procedures for taking bioptic tissues for the screening of blood donors or for epidemiological surveys. Moreover, while the detection of PrP^{res} indicates always the presence of infectivity, its absence is not an assurance that the tissue or the host is not infected. There is therefore an urgent need for better technologies to identify PrP^{res} or for novel diagnostic markers in TSE diseases.

Despite scrapie, a TSE disease occurring in sheep and goats, is known to be transmissible for almost 100 years, the nature of the infectious agent remains an enigma. It might contain a nucleic acid and thus be similar to a virus though with unconventional properties or, alternatively, it might be only composed of one or more proteins without any informative nucleic acid molecule (prion hypothesis). The latter hypothesis envisages that some abnormal form of PrP (likely not in the aggregate state as PrP^{res}, but in some other poorly aggregate forms, named PrP^{Sc} or PrP*) is the major or only component of the infectious agent. According to the prion hypothesis, PrP^{Sc} is able to catalyse the conversion of PrP^{c} into the abnormal form. In sporadic CJD, *de novo* infectivity may generate by chance or as a result of a yet unknown somatic mutation in the cell of the host. In genetic TSEs, germline point or insert mutations in the PrP gene (*PRNP*) would trigger the spontaneous formation of PrP^{Sc}, but transgenic mice carrying several copies of the mutated PrP gene do not develop spongiform encephalopathy or produce infectivity. In the infectious forms of TSE diseases (iatrogenic or variant CJD, BSE, and experimentally induced TSEs in laboratory animals), the introduction of exogenous abnormal PrP may trigger the conformational change in the PrP^{c} of the recipient host. In the viral hypothesis, the conformational change of PrP^{c} is triggered by a yet unidentified exogenous agent containing the informative nucleic acid molecule. Both theories have pros and contras. The most important evidence in favour of the prion hypothesis is the finding that PrP^{res} is the most abundant macromolecule found in infected fractions. However, it is not the only one and traces of other proteins or nucleic acids are still present, and *de novo* formation of PrP^{res} in cell free systems is not accompanied by an increase in infectivity. Conversely, no specific nucleic acids have been isolated in purified fractions containing high level of infectivity. The other interesting enigma is the presence of biologically distinct strains of TSE in animals carrying the same PrP gene. Different strains produce distinct clinical, pathological, biochemical and biophysical phenotypes. Presence of strains is easily understand in infectious agents containing nucleic acid, but is more difficult to reconcile with the prion theory. It has been proposed that the information for each diverse phenotype is built up in the tridimensional structure of pathological PrP. Indeed, indirect data based upon differences in the affinity of monoclonal antibodies to PrP or the size of PrP^{res} at western blot after proteinase K digestion confirm that PrP^{res} may exist in several conformers. It remains however to establish the structures of PrP^{res} or PrP^{Sc} and how they differ when associated to distinct TSE strains. Another enigma is the notoriously resistance of TSE agents to chemical and physical procedures that inactivate conventional viruses. This supports the hypothesis that these agents do not contain any nucleic acid. However, some of these data are overestimated since the majority of TSE infectivity shows kinetics of inactivation similar to conventional viruses. The spectrum for inactivation of the scrapie agent by UV irradiation fell within the range of pure protein targets, but cannot eliminate the possibility that it contains a small, highly protected nucleic acid molecule. Similarly, the dose of X-ray irradiation required for scrapie inactivation is compatible with a genome size of small viruses (2-4 kb). These data do not imply that the prion or the virus hypotheses are incorrect, but simply address the difficulty to reconcile all the biological properties of TSE diseases with one or the other theory.

Though the nature of the agent is still a mystery, the role of PrP in TSE diseases is of paramount importance. The expression of PrP^{c} is required for the propagation of infectivity and the development of disease. Moreover, even one or two changes in the amino acid sequence of PrP^{c} renders often an animal species susceptible or resistant from the infection of a given TSE strain. The appearance of BSE-related diseases in humans and several other animal species, all with distinct PrP sequences, however, clearly indicates that it is impossible to predict solely by analysis of PrP sequences the extent of such resistance. Finally, the identification of the real nature of the TSE agent would improve the development of diagnostic and therapeutic strategies.

SESSIONE 7

Comune AMCLI-SIBioC

IL LABORATORIO NELLA ENCEFALOPATIA SPONGIFORME

Sala C

Venerdì 11 giugno, ore 10.15-13.00

S7.1

OLFACTORY INVOLVEMENT IN HUMAN AND ANIMAL TSEs

Zanusso G.

Dept. of Neurological and Visual Sciences, Section of Clinical Neurology,
University of Verona, Verona Italy

Olfactory system involvement is frequently observed in both human and animal affected with TSEs. We observed in 52 sporadic Cretzfeldt-Jakob Disease cases that olfactory system is invariably involved and that PrPSc is deposited along the olfactory pathway. More interestingly, PrPSc was found at the level of cilia and basal cells of the neuroepithelium, located in the nasal vault and thus easily sampled for biopsy (Zanusso et al. NEJM 2003). We extended the study to nasal biopsies and so far we obtained nasal biopsy from three patients with probable sCJD. All cases showed PrPSc deposition in basal cells and more faintly at the level of cilia of the neuroepithelium. Controls with Alzheimer's disease, Parkinson's disease and corticobasal degeneration were negative for PrP staining (Tabaton et al. Ann Neurol 2004).
Concerning animal TSE, in chronic wasting disease olfactory system is mainly affected in both free ranging and in captive animals. Recently, we have shown that olfactory system represents a brain area where a consistent PrP deposition is observed in cattle affected with a novel form of amyloid-associated BSE (BASE). Aim of our studies is to detect whether olfactory system might represent a potential tissue for intravital diagnostics in humans and animals

S7.2

STRATEGIE PER IL CONTROLLO DELLE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI ANIMALI IN ITALIA

Mutinelli F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Legnaro (PD)

La crisi della BSE ha chiaramente evidenziato le debolezze del sistema europeo nell'affrontare emergenze sanitarie di tale portata. Come in altre crisi sanitarie, anche in questo caso si è faticato a gestire gli eventi e a prendere decisioni tali da evitare sia l'aggravarsi delle situazioni, sia il diffondersi di atteggiamenti dettati dal panico. Viene presentata una sintesi delle strategie di sorveglianza passiva ed attiva applicate dai Servizi Veterinari per il controllo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili animali in Italia a partire dalla comparsa dell'epidemia del Regno Unito ad oggi, in funzione dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche e delle disposizioni normative emanate. Già nel 1990 il Ministero della Salute aveva proceduto ad attivare un sistema di sorveglianza passiva diretto a verificare ed a migliorare le capacità diagnostiche della rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. La BSE e la scrapie sono state inserite fra le malattie soggette a denuncia a partire dal 1991. Dal novembre del 2000 tutti gli stati dell'Unione Europea hanno deciso di adottare misure comuni tese al controllo ed alla eradicazione della BSE dai propri allevamenti. Questo si è concretizzato nel Regolamento (CE) 999/2001 recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili. Con il Decreto 7 gennaio 2000 è stato definito il "Sistema nazionale di sorveglianza epidemiologica della encefalopatia spongiforme bovina (BSE)". Nel gennaio 2001 ha avuto inizio il piano di sorveglianza attiva, mediante metodiche innovative (Decisione 2000/374/CE e più recentemente Regolamento (CE) 1053/2003), diretto ad identificare la presenza della BSE in animali, al di sopra dei 30 mesi di età, regolarmente macellati, e a rischio, morti in azienda e con sintomatologia di tipo neurologico. Il limite di età è stato successivamente abbassato a 24 mesi. Va ricordato che le metodiche utilizzate consentono di ottenere la risposta del laboratorio entro tempi molto brevi, a differenza del passato, compatibili con le esigenze di conservazione e commercializzazione delle carni. Il piano di sorveglianza nazionale della scrapie è stato attivato nel 2002 a seguito dell'entrata in vigore del Regolamento (CE) 270/2002. Dal 2 gennaio 2001 all'1 marzo 2004, in Italia sono stati effettuati 2.136.320 test rapidi per BSE e dal 2002 ad oggi 84.074 per scrapie. Questo sistema di sorveglianza attiva ha permesso di rilevare 118 casi di BSE. A tutt'oggi sono stati invece diagnosticati 146 focolai di scrapie. Quale altra misura fondamentale è stata individuata la rimozione, in fase di macellazione, del materiale specifico a rischio (SRM): intesi

SESSIONE 7

Comune AMCLI-SIBioC

IL LABORATORIO NELLA ENCEFALOPATIA SPONGIFORME

Sala C

Venerdì 11 giugno, ore 10.15-13.00

S7.2

come testa, inclusi occhi e cervello, tonsille, colonna vetebrale e midollo spinale, per bovini e ovicaprini di età superiore ai 12 mesi, nonchè intestini, dal duodeno al retto, per i bovini di tutte le età, e milza e ileo per gli ovicaprini di tutte le età. A tutt'oggi, si ritiene infatti che in questi organi sia concentrata l'infettività e quindi che una loro precoce eliminazione sia sufficiente a proteggere il consumatore. Ulteriori verifiche della contaminazione da parte di materiale specifico a rischio potranno essere effettuate in sede di macellazione secondo quanto previsto dal Regolamento (CE) 1139/2003. Ancora il divieto dell'utilizzo di proteine animali per l'alimentazione dei ruminanti e successivamente di tutti gli erbivori, nonché l'attivazione di un programma nazionale di controllo in questo settore ha permesso di approfondire le conoscenze in questo settore e di evidenziare l'utilizzo di componenti non più autorizzati fin dal 1994. Nel 2002 è iniziato anche il piano di sorveglianza nazionale della scrapie basato anch'esso sull'utilizzo dei test rapidi eseguiti su animali regolarmente macellati o morti, nonché sintomatici, di età superiore a 18 mesi. Accanto alla sorveglianza attiva della scrapie e sulla base delle esperienze già maturate in altri stati europei (Regno Unito, Germania, Francia), l'Unione Europea ha legiferato così da rendere possibile l'attivazione di piani di eradicazione della scrapie basati sulla selezione genetica degli ovini nei confronti della suscettibilità a questa malattia (Regolamento (CE) 260/2002, Decisione 2002/1003/CE, Decisione 2003/100/CE). Anche la normativa che regola il trattamento dei rifiuti derivanti dalla macellazione e dall'attività diagnostica veterinaria, nonché delle misure di sicurezza da adottare per garantire la sicurezza degli operatori, è stata riconsiderata alla luce degli eventi connessi alle TSE, in particolare attraverso il Regolamento (CE) 1774/2002 "Gestione dei sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano" e più recentemente con il D.M. 16 ottobre 2003 "Misure sanitarie di protezione contro le encefalopatie spongiformi trasmissibili". Si sottolinea infine l'importanza di una corretta comunicazione delle strategie e delle misure adottate per il controllo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili animali, considerata l'importanza che le stesse hanno acquisito negli ultimi anni sia come patologia specifica dei ruminanti sia per gli aspetti zoonosici della BSE.

S7.3

HIGH PRESSURE/TEMPERATURE INACTIVATION OF TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES INFECTIVITY

Cardone F.§, Brown P.*, Meyer R.‡, Liu Q.§, Lu M.§, Valanzano A.§, Berardi V.§ , Pocchiari M.§

§Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy, *National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA ‡Washington Farms, Tacoma, WA 98443, USA

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) contamination of the human food chain most likely resulted from nervous system tissue in mechanically recovered meat used in the manufacture of processed meats. The widespread occurrence of BSE, coupled with uncertainties about the rigorous implementation of precautionary measures, underline the need for a processing step that would ensure the absence of infectivity in processed meat products.

We have previously shown that the application of several short pulses of high pressure (690-1200 MPa) to hot dog paste 'spiked' with 263K scrapie-infected brain can reduce the level of infectivity by 103 to 106 mean lethal doses (LD50) per gram of tissue (Brown P. et al., PNAS 100: 6093–6097, 2003). By using the same scrapie strain, we have recently explored a larger range of pressure/temperature/pulse combinations, and a variety of processed meat products (e.g., hamburger, pureed baby food, paté, meat broth, and pet food) as substrates. We have also studied high pressure inactivation of other strains of transmissible spongiform encephalopathies, (BSE; mouse adapted BSE, mBSE; mouse adapted vCJD, mvCJD).

Brain samples from BSE, mBSE, mvCJD and 263K affected animals were treated at 600MPa/130°C/5' and then assayed by western blotting to measure the amount of residual PrPres. In order to get an accurate estimate of PrPres concentration, each sample was analysed using a two-fold dilution series. This experimental setting allowed us to demonstrate a reduction in the content of PrPres in all treated samples in comparison with their untreated counterparts: mvCJD and 263K showed the highest reduction (32-fold, about 1.5 log), whereas BSE and mBSE showed only a 4 to 8 fold reduction respectively.

In the second part of this study, 263K-spiked hot-dog aliquots were subjected to a range of different combinations of pressure, temperature and length of treatment. Results from western blot analysis of these samples showed that an exposure as short as 1-minute yields 1 log reduction of PrPres, and that the maximal extent of PrPres clearance (1.5 log) is obtained after 3 minutes, with no increase after further exposure. Keeping the time and temperature constant, progressive destruction of PrPres was observed with pressure increases from 600 to 1000 MPa; keeping time and pressure constant, a similar outcome was obtained when the temperature was increased incrementally from 115 to 134°C.

SESSIONE 7

Comune AMCLI-SIBioC

IL LABORATORIO NELLA ENCEFALOPATIA SPONGIFORME

Sala C

Venerdì 11 giugno, ore 10.15-12.45

S7.3

The results of our study indicate that sensitivity to high pressure treatment is strain-specific, with the maximal effect observed in brain samples from animals infected with the 263K and mvCJD inocula. This is not surprising when considering that TSEs infectious strains can be easily distinguished on the basis of their pathological, biochemical, and physical properties, such as the resistance to inactivation following autoclaving or dry heat processing (Somerville R.A. et al., J. Biol. Chem. 277: 11084-11089, 2002). The small reduction in PrPres concentration in cattle and mouse BSE is in accordance with data obtained by other authors using hydrated autoclaving and confirm that this strain is particularly resistant to inactivation procedures (Taylor D. et al., J. Gen. Virol. 83: 3199-3204, 2002). These results, while awaiting support by ongoing infectivity bioassay studies, suggest that the BSE agent requires a different combination of conditions to achieve satisfactory decontamination. We have previously observed that pressures of 1200 MPa result in loss of 106 mean lethal doses per gram of 263K scrapie-infected brain tissue, however, the use of harsh conditions of treatment in an industrial setting may encounter technical constraints and has to be weighed against the possible alteration of the food product. The definition of the process of PrPres clearance as the sum of pressure, temperature and time shows how to deal with this limitation: the same PrPres clearance can be obtained at two different pressures simply adjusting the peak temperature or, to a lesser extent, the time of treatment. These data (always subject to bioassay confirmation) will provide a useful background to develop inactivation protocols specifically designed for each food product yielding the desired combination of quality and safety.

SESSIONE 8

IMMUNOMETRIA OGGI

Sala E

Venerdì 11 giugno, ore 10.00-13.00

S8.1

DOES CONSOLIDATION PRESERVE IMMUNO-ASSAY SPECIFICITY?

Messeri G.

Central Clinical Biochemistry Laboratory, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze, Italy

Consolidation of immunoassay with other laboratory technologies may meet with some difficulties, due to the claimed specificity of this technique. This may arise from technical, historical and psychological issues. The analytes to be measured are often at picogram level. Reagents and reference preparations are often biological product. The results are highly method-dependent and the test standardization is often very poor. The calibration curves are not linear and may contribute to systematic errors. The analytical procedure requires often a separation step (bound and free fraction), and this requires more complex analytical platforms. Moreover, the cost of immunoassay test is much higher than that of the most common chemistry test. In many cases immunoassay was born out of conventional Clinical Biochemistry labs (Nuclear Medicine) and immunoassay people grew fond of their "specificity". Two main trends, someway apparently conflicting each other, affect now immunoassay:
1)the availability on the market of integrated platforms, capable of performing both general chemistry and immunoassay,
2)the birth of new technologies capable of performing huge number of immunoassay, even at the same time (chips, multiple assay)
In other words, the first solution proposes a consolidation of clinical biochemistry tests, irrespective of the technology they are produced by, the second one requires the consolidation of a huge number of immunoassay tests in order to feed such a high throughput machine. The risk of the full integration is that quality cannot be equally optimized for all the tests of the menu, and that a compromise must be achieved. On the other hand, high throughput machine may require, to be cost-effective, the consolidation of all the immunoassays performed in a lab (hormones, drugs, tumor marker, drugs, infectivology) and also of samples sent by other labs (service). Finally, integrated platforms could be useful for emergency tests, requiring very low TAT, whereas multiple immunoassay might be suitable for screening purposes (e.g. toxicology) or, in the future, for protein profiling.

Integration with microbiology and toxicology
Integration by tchnology
Integration by volume

S8.2

NEW TECHNOLOGIES FOR MULTIPLEXED IMMUNOASSAYS

Binder S.R.

Director of Technology Development, Clinical Diagnostics Group, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. USA

The diagnostic development of multiplexed technologies has been driven by the need to provide higher throughput to the clinical laboratory, as well as the desire to address more complex biological questions that cannot be resolved with a single result. Multiplexed assays may be performed on planar arrays or with labeled beads in solution ("liquid arrays"). Two approaches are of great interest for immunoassays: 1) antigen arrays, in which multiple proteins or peptides are attached to the surface to capture antibodies of interest, and 2) antibody arrays, in which multiple antibodies are attached to the surface for the purpose of capturing target antigens. The antigen array requires appropriate orientation of the protein to assure that the epitope is properly exposed. The antibody array obviates the issue of diverse attachments to the surface, but introduces the problem of diversity in the introduction of multiple secondary antibodies. Much effort is underway towards the development of universal detection methods, which in some cases require no additional reagent additions. This presentation will survey work reported to date on the development of multiplexed immunoassays with clinical applications, in particular for autoimmune antibodies and cytokines. The critical issues of precision, accuracy, specificity and interferences will be highlighted for these new methods. The use of software to communicate and eventually interpret the output of these products will be discussed. The comparative advantages of planar and bead-based arrays will be reviewed. Also, the instrumentation that is currently available will be presented.

SESSIONE 8
IMMUNOMETRIA OGGI
Sala E
Venerdì 11 giugno, ore 10.00-13.00

S8.3

THE IMMUNOASSAYS BETWEEN COMPLEXITY AND INNOVATION: THE PARATHYROID HORMONE CASE

Migliardi M., Marranca D.

Laboratorio di Ormonologia, U.O.A. di Endocrinologia, Ospedale Mauriziano "Umberto I", Torino, Italy

Parathyroid hormone (PTH) is the most important endocrine regulator of calcium and phosphorus concentration in extracellular fluid and is central in the pathogenesis of bone disease in primary and secondary hyperparathyroidism. This hormone (a linear polypeptide 84 amino acids in length) is secreted from cells of the parathyroid glands and finds its major target cells in bone and kidney. The biological effects of PTH reflect activation of the G-protein-coupled PTH/PTHrP receptor (PTHR) expressed on target cells in the renal tubules and the osteoblastic lineage of bone. Activation of PTHRs requires only the most N-terminal portion of PTH and is mostly eliminated if the N-terminal serine residue of the human hormone is removed.

Apart from its effect to regulate PTH release, variations in blood ionised calcium concentration also influence PTH metabolism. It is generally thought that PTH is secreted predominantly as PTH(1–84), but the hormone is degraded within parathyroid cells and some of the resultant N-terminally truncated, or C-terminal, fragments are released into peripheral blood. The ratio of these fragments to intact PTH increases as blood calcium increases. Typically, they circulate at a three- to fivefold molar excess over intact PTH. PTH is also metabolised in several peripheral tissues, including the liver. PTH and its various fragments are removed from the circulation by glomerular filtration in the kidney. They are subsequently degraded in cells of the proximal nephron. In patients with renal failure, the plasma clearance of PTH and other PTH fragments is reduced, leading to the accumulation of C-terminal peptides in peripheral blood.

Accurate and reliable measurement of circulating biologically active PTH is crucial for the differential diagnosis of hypercalcemia and hypocalcemia and in the diagnosis and management of primary hyperparathyroidism, vitamin D deficiency, and renal osteodystrophy. The presence of N-terminally truncated, or C-terminal, PTH fragments in plasma, particularly in patients with renal failure, has always presented a major technical challenge in the development of valid PTH assays. It is now generally recognized that the classic "intact PTH" two-site immunometric assays do not measure exclusively the full-length biologically active hormone. Rather, these assays also detect the recently identified large (N-terminally truncated) PTH fragments, collectively termed "non-(1–84) PTH", that are present in plasma, not only in patients with chronic renal failure but also in those with normal renal function. Recent experimental evidence suggests that some of these peptides have biological actions in bone that are distinct from those traditionally ascribed to PTH. Such findings may have important implications for the diagnosis and management of patients with renal bone disease and for understanding bone biology. Moreover, they have prompted a reassessment of the methods used to measure PTH in serum or plasma.

PTH measurement still presents some important problems, considering the molecular heterogeneity and the different specificity of sandwich immunometric methods. A number of preanalytical variation factors can affect the assay: intraindividual biological variability (pulsatile secretion, circadian rhythm), interindividual variability (sex, age, genetics factors), as well as sample typology and way of storage. In addition to the molecular heterogeneity (N-terminally truncated, or C-terminal, fragments, included the recently identified non-(1-84) PTH molecular forms which may interfere with "intact PTH" methods), the factors affecting the analytical variability may concern the antibody interference (anti-PTH autoantibodies and heterophilic antibodies) and, particularly, the calibration differences existing among the commercially available assays. In order to evaluate these differences, we performed recovery tests with both synthetic hPTH (1-84) from Bachem and recombinant hPTH (1-84) 95/646 from NIBSC. The results are similar to those recently obtained by UK-NEQAS and highlight remarkable between-method calibration differences, which are the main reason for the disagreements among PTH values obtained with different kits. On the contrary, no relationship apparently exists between the cross-reactivity with synthetic hPTH (7-84) fragment and the method bias. Therefore, the lack of an International Standard is, at present, the main obstacle to solving the standardization problems related to PTH measurement.

In the future, the ability to selectively measure the concentration of various N-terminally truncated PTH fragments will provide, probably, additional opportunities to explore the potential role of these molecules in the regulation of bone metabolism.

References

1.Migliardi M, Marranca D. La misura del paratormone: fattori di variabilità e problemi di standardizzazione. Ligand Assay 2002; 7:18-25.

2.Marangella M, Migliardi M, et al. Intact whole bioactive parathormone: problems arising from comparing different methods. G Ital Nefrol 2002; 19:467-75.

3.Seth J, Ellis A, Sturgeon C. UK NEQAS for peptide hormones and related substances. Annual Review 2002; 24-7.

4.Goodman WG, Salusky IB and Jüppner H. New lessons from old assays: parathyroid hormone (PTH), its receptors, and the potential biological relevance of PTH fragments. Nephrol Dial Transplant 2002; 17:1731-6.

5.Bringhurst FR. Circulating forms of parathyroid hormone: peeling back the onion. Clin Chem 2003; 49:1973-5.

SESSIONE 8

IMMUNOMETRIA OGGI

Sala E

Venerdì 11 giugno, ore 10.00-13.00

S8.4

IMPROVEMENT IN ANALYTICAL QUALITY OF IMMUNOASSAY FOR HORMONES AND TUMOUR MARKERS

Zucchelli G.C., Pilo A., Cohen R.1, Chiesa M.R., Mercuri A., Masini S., Conte R., Cantini F.

Institute of Clinical Physiology, CNR, Pisa (Italy)
1Radio-isotopes immuno-analyse, Hopital E. Herriot, Lyon (France)

External Quality Assessment Schemes (EQAS) are useful tools in evaluating the overall analytical quality of assays. Since 1980, our Institute has been carrying out EQAS of immunoassays; during 2003 about 1300 laboratories have been involved in Immunocheck scheme (international program for hormones organized in co-operation with the French program ProBioQual, Centre Lyonnais d'études pour la Promotion de la Biologie et du controle de Qualitè, Lyon); in addition about 350 laboratories have been involved in Oncocheck scheme (international program for tumour markers, organized in co-operation with Service de Radiopharmacie et Radioanalyse, Lyon). Every year, participants assayed 18 control samples in Immunocheck and 24 in Oncocheck scheme; statistics of collected results were prepared and circulated sending back to the laboratories periodic and cumulative reports. Periodic report contains the result of the laboratory and its percent deviation from both the consensus mean and the method mean; statistics of all results and of results produced by the most used methods are also reported. Cumulative report contains estimate of average analytical performance achieved in assaying all the control samples distributed in the cycle; in addition, the report contains estimates of the analytical performance (imprecision and bias) of the most used methods based on data accumulated in the cycle. To allow laboratories an easy evaluation of their own analytical performance, a new scoring system has been recently adopted. Each result is scored according to its deviation from target value expressed in SD units (Z-value). In detail the scores are: 4(excellent) if Z <0.5, 3 (good) if 0.5<Z<1, 2 (sufficient) if 1<Z<2, 1 (inadequate) if 2<Z<3, -2 (unacceptable) if Z >3.

Z-value is computed as ratio of percent deviation from target and "state-of-the-art" imprecision. Method mean is assumed as target; "state-of-the-art" imprecision is computed as mean CV of the methods most used in the survey. To take account that imprecision depends on the analyte concentration, three CVs are computed corresponding to three concentration ranges.

The following table reports for each analyte the concentration and the "state-of-the-art" CVs (within-method, between-laboratories imprecision) computed from the Immunocheck and Oncocheck data-base (results collected during 2003 EQA cycles).

	"state- of- the- art" CV%					
	%	**conc**	**%**	**conc**	**%**	**conc**
fT3 (pg/mL)	**12**	<2.5	**9**	<4	**7**	>4
fT4 (pg/mL)	**11**	<7	**8.5**	<12	**7**	>12
TSH (µIU/mL)	**25**	<0.1	**12**	<0.3	**7.5**	>0.3
LH (mIU/mL)	**13**	<2	**8.5**	<7	**7.5**	>7
FSH (mIU/mL)	**13**	<4	**8.5**	<7	**7.5**	>7
hCG (mIU/mL)	**25**	<4	**10**	<20	**8**	>20
Prol (µIU/mL)	**25**	<50	**12**	<100	**9**	>100
Ferr (ng/mL)	**13.5**	<20	**12.5**	<100	**11**	>100
hGH (µIU/mL)	**20**	<3	**14**	<15	**12**	>15
Ins (µIU/mL)	**20**	<7	**11.5**	<15	**10**	>15
Aldo (pg/mL)	**30**	<40	**25**	<100	**15**	>100
Cort (µg/dL)	**12**	<7	**10**	<14	**9**	>14
Dhea (µg/mL)	**18**	<1	**17**	<2.5	**16**	>2.5
E2 (pg/mL)	**30**	<50	**14**	<150	**10**	>150
Prog (ng/mL)	**25**	<0.8	**16**	<2	**10**	>2
Testo (ng/mL)	**30**	<0.6	**16**	<2	**10**	>2
AFP (UI/mL)	**18**	<7	**8**	<50	**8**	>50
CEA (ng/mL)	**14**	<5	**9**	<20	**9**	>20
CA19-9 (U/mL)	**18**	<15	**10**	<70	**10**	>70
CA15-3 (U/mL)	**14**	<10	**9**	<50	**9**	>50
CA125 (U/mL)	**14**	<12	**10**	<70	**10**	>70
tPSA (ng/mL)	**12**	<2	**7**	<10	**7**	>10
fPSA (ng/mL)	**15**	<0.3	**10**	<2	**10**	>2

While "state-of-the-art" CV seems adequate for several analytes, poor within-method imprecision is still observed in the measurement of hGH and of steroid hormones (Aldosterone, E2, Progesterone, Testosterone) particularly in the low concentration range.

Comparison of analytical performance observed in 2003 EQA with that of about 10 years ago, shows a general improvement. In particular a marked improvement is evident for TSH and for total PSA assays. As an example, in TSH assay a control sample (with concentration of 0.15 µIU/mL) circulated in 1994 cycle showed a total variability of 44.6 CV%; in the last cycle (2003) the total variability of a control sample at similar concentration (0.16 µIU/mL) decreased to 29.3 CV%. This improvement is mainly attributable to a reduction of the within-method variability (from 35.5 to 15.1%). For total PSA we observed, comparing two control samples (at similar concentration of about 4.5 ng/mL) distributed in 1995 and in 2003 cycles, that the total variability decreased from 29.2 to 8.1 CV% due to both an improvement of within-method variability and a reduction of systematic between-methods differences.

SESSIONE 8

IMMUNOMETRIA OGGI

Sala E

Venerdì 11 giugno, ore 10.00-13.00

S8.5

ALDOSTERON AND CORTISOL MEASUREMENT IN URINE SAMPLES: AUTOMATION DOESN'T SOLVE SPECIFICITY PROBLEMS

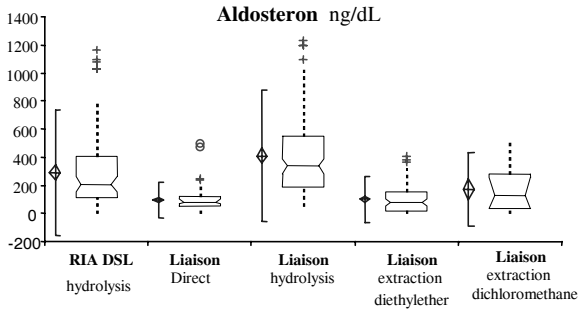
Fortunato A.

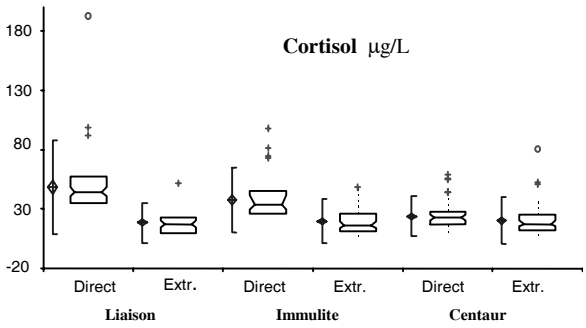
Ospedale "San Bortolo" – Viale Rodolfi, 37 - Vicenza

The detection of Aldosteron and Cortisol levels in urine samples is very useful from a clinical point of view. It must be remembered that, while the 24-hour urinary hormone measurement is an integrated reflection of the daily secretion, the plasma values may reflect only a single point in time and since plasma level shows typical bursts, which follow a circadian rhythm, it might not be safe to draw valid conclusions from a single determination. Therefore, while plasma measurement is more suitable for acute studies (like circadian rhythms, postural changes, acute effect of drugs), the 24-hour urinary measurement is the method of choice for clinical investigations.

Frequently the use of automated systems, since they are very simple and fast, gives the illusion that they can be used also for direct hormone measurement in urine samples. The first problem to be considered is the matrix effect of urine samples: the samples extraction with organic solvents allows to substitute the urine matrix with a serum based one (optimum conditions for immunoassay).

In our laboratory we used some widely used immunoassay systems to test their performance for Aldosteron and Cortisol measurement: in particular the need of preanalitycal steps (extraction with organic solvents) was investigated. For Cortisol we compared direct measurement with dichloromethane extraction, while for Aldosteron direct measurement with acidic hydrolysis and either dichloromethane or diethyl-ether extraction were compared.





ABSTRACT POSTER

Poster

- **001 - 003** Analisi decentrate
- **004 - 007** Applicazioni informatiche
- **008 - 014** Automazione e gestione del laboratorio
- **015 - 064** Biologia molecolare
- **065 - 072** Coagulazione
- **073 - 095** Controllo e gestione della qualità
- **096 - 097** Diabete
- **098 - 119** Ematologia
- **120 - 132** Endocrinologia
- **133 - 150** Farmacologia e tossicologia
- **151 - 155** Tecniche separative
- **156 - 174** Immunologia, autoimmunità
- **175 - 181** Immunometria
- **182 - 185** Lipidi, lipoproteine
- **186 - 207** Marcatori cardiaci
- **208 - 214** Marcatori di neoplasia
- **215 - 217** Medicina dello sport
- **218 - 238** Proteine, enzimi
- **239 - 266** Studi clinici
- **267 - 285** Valutazione di strumenti e prodotti
- **286 - 292** Varie

001

POCT A CORTINA D'AMPEZZO (BL). ATTIVITA' ANALITICA DECENTRATA PRESSO IL PPI DI UNA REALTA' TERRITORIALE COMPLESSA.

Del Giudice G.; Roncada T.; Tocchio A.*; Bellenzier M.; Olivotto F.; Rocchi A.

U.O.A. Laboratorio Analisi Chim-clin e Microbiologia, * U.O.A. Pronto Soccorso Osp. Pieve di Cadore (BL).

PREMESSA: la riorganizzazione ospedaliera in Cadore ha comportato la chiusura del laboratorio dell'Istituto ortopedico Codivilla-Putti di Cortina d'Ampezzo con conseguente gestione delle ordinarie indagini di laboratorio presso l'ospedale di Pieve di Cadore. ANALISI E FINALITA': la distanza tra i due ospedali (35 Km) e il notevole afflusso turistico in estate e inverno in una delle più rinomate località turistiche d'Italia, ha reso obbligatorio soddisfare in loco le richieste di esami urgenti provenienti sia dal Punto di Primo Intervento (PPI) che dai reparti dell'Istituto. E' stata quindi decisa l'istituzione di un laboratorio decentrato (POCT) in una stanza dedicata presso il PPI di Cortina. La scelta della strumentazione è ricaduta su apparecchi di facile uso e manutenzione da parte di operatori non provenienti dal laboratorio. In modo particolare per la chimica è stato scelto uno Spotchem EZ (Menarini; glucosio, BUN, bilirubina tot., AST, ALT, creatinina, amilasi) che ha il pregio di eseguire più analisi in una sola seduta (fino a nove parametri) con notevole risparmio di tempo di esecuzione ed impegno da parte dell'operatore. Per la coagulazione la scelta è stata rivolta al Rapid Point Coag (Bayer) in quanto permette di lavorare con sangue raccolto in provetta. Un tentativo iniziale con esecuzione diretta da sangue intero senza anticoagulanti non ha riscontrato successo tra il personale infermieristico in quanto è necessario ricorrere a più prelievi (uno per PT e uno per aPTT) con siringa. Gli altri strumenti in uso sono un GEM Premier 3000 (IL; emogas-elettroliti), un Cardiac Reader (Roche; troponina, mioglobina, D-Dimero), un Ac.T diff 2 (IL; emocromo). Il tutto è gestito in loco e controllato da Pieve per mezzo del software gestionale AstroLabPOC (Roche). Il personale infermieristico è stato formato "sul campo" e le procedure descritte in un apposito Manuale. Controlli di qualità, manutenzione straordinaria e gestione del magazzino sono a carico del laboratorio. RISULTATI: in circa sei mesi di attività sono state soddisfatte 910 richieste, 326 (35.8%) dal PPI e 584 (64.2%) dai reparti, con un tempo medio di risposta ridotto di circa 15-30 minuti rispetto a quanto fornito dal laboratorio in loco. CONCLUSIONI: l'uso di strumentazione "amichevole", l'addestramento "sul campo", la disponibilità di procedure scritte, l'assistenza continua da parte del personale del laboratorio ha permesso di contenere le iniziali diffidenze del personale infermieristico del PPI. Inoltre questa esperienza ha consentito un maggiore contatto tra laboratorio e clinica che ha portato ad approfondire le reciproche esigenze necessarie a fornire una corretta risposta ai quesiti clinici in urgenza.

002

VALUTAZIONE DI UN METODO SU STRISCIA REATTIVA PER LA MISURA DELLA ALBUMINA URINARIA IN UN POINT OF CARE TESTING

Mantovani L, Graziani MS.

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM, Azienda Ospedaliera di Verona

Scopo: Valutare le caratteristiche di un metodo in chimica secca per la misura della escrezione della albumina urinaria.
Materiali e Metodi: Strumento: Clinitek Status (Bayer Diagnostici). Metodo: Calcolo del rapporto Albumina/Creatinina (A/C); il risultato è semiquantitativo (<30; 30-300; >300 mg/g). Reattivi: Albumina, colorante tetrabromosulfonftaleina, pH 1.5; Creatinina, attività pseudoperossidasica del complesso rame-creatinina. Metodo di confronto: Albumina, nefelometrico su Immage (Beckman Coulter); Creatinina, Jaffè su Dimension RxL (Dade-Behring); Campioni: 169 campioni successivi provenienti dal Centro Antidiabetico, 10 campioni con proteinuria da overflow.
Risultati: i valori dei campioni dei pazienti diabetici concordano in 157 casi, con 9 falsi positivi e 3 falsi negativi. La sensibilità e la specificità del metodo sono rispettivamente 89% e 96%; il valore predittivo positivo e negativo sono 83% e 97% con una prevalenza della alterazione nella popolazione esaminata del 18% ad un cut off di A/C di 30 mg/g. I campioni discrepanti non presentano (all'esame urine standard e all'elettroforesi proteica) caratteristiche che li differenzino dai campioni concordanti. 10 campioni con marcata proteinuria di Bence Jones presentano valori di albumina (e quindi di A/C) sensibilmente più elevati rispetto al metodo di confronto.
Discussione: l'escrezione di albumina dovrebbe essere valutata annualmente nei pazienti diabetici (1) e l'utilizzo di un test di screening decentrato potrebbe consentire una più efficiente gestione clinica del paziente. Il metodo esaminato presenta caratteristiche analitiche tali da consentire questo utilizzo (nella popolazione esaminata solo 3 falsi negativi e 9 falsi positivi). La presenza di elevate concentrazioni di proteina di Bence Jones può determinare sovrastima dei risultati di microalbuminuria; tuttavia questa alterazione è poco frequente nella popolazione diabetica. Un flusso di lavoro che prevedesse l'invio al laboratorio dei soli campioni positivi al test di screening, farebbe risparmiare l'esecuzione di circa l'80% delle richieste per microalbumina, con sensibile risparmio economico (il test immunologico in laboratorio risulta più costoso del test in chimica secca) e consentirebbe una gestione immediata del paziente negativo.

1. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care 2002;25:213:29

003

LA QUALITA' DELL'EMOGASANALISI IN UN COMPLESSO OSPEDALIERO DI GRANDI DIMENSIONI

Tronchin M., Salti S., Artioli S., Targioni G., Ognibene A., Poggesi M., Rapi S., Messeri G.

Laboratorio Centrale Analisi Biochimico-Cliniche – Piastra dei Servizi - Azienda Ospedaliera "Careggi" – Firenze

L' Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi di Firenze dispone di 28 emogasanalizzatori (ABL, varie versioni, - Radiometer, Copenhagen) . Tra questi, venti sono connessi in rete (intranet) con una workstation situata nel Laboratorio Centrale, dalla quale sono costantemente monitorati mediante un programma dedicato (Radiance - Radiometer). Gli apparecchi, analizzano in completa automazione 8 campioni di controllo a settimana, su quattro livelli per analita (pH, pO2, pCO2, Na, K……). Le fiale con i controlli sono contenute in un carrello, a bordo dello strumento, che deve essere rifornito manualmente ogni venti controlli. La presenza di più livelli e di più lotti per livello complica l'elaborazione di dati sul lungo periodo. Non disponendo quindi di un lotto unico si è proceduto al calcolo della media ponderata per concentrazioni simili (stesso livello) su un periodo quadrimestrale (settembre–dicembre 2003), paragonando questo periodo (sotto monitoraggio centralizzato) all'ultimo quadrimestre del 2002 (senza monitoraggio centralizzato). I CV degli analiti mostrano una dipendenza dalla concentrazione che viene discussa nel dettaglio. Sono state rilevate differenze significative tra strumenti, che indicano la necessità di un intervento approfondito su alcuni apparecchi particolarmente problematici, in genere per problemi di gestione da parte del reparto. I CV medi risultano generalmente superiori ai traguardi analitici ed ai CV degli stessi analiti misurati in laboratorio centrale. Tra i parametri propri dell'emogasanalisi il pH mostra valori di CV che oscillano tra lo 0.01% e l'8.3% (mediana 0.2%, traguardo analitico 0.3%), la pCO_2 oscilla tra 0.8% e 25.9% (mediana 6.6%, traguardo analitico 2%) mentre la pO_2 varia tra 1.7% e 21.3% (mediana 5.1%, traguardo analitico 4%). I risultati del 2002 (pre-monitoraggio) sembrano a prima vista molto migliori che nel 2003, ma un'analisi sui controlli effettuati mostra che nel 2002 l'88% delle macchine aveva eseguito meno del 20% dei controlli previsti (presumibilmente solo quelli contemporanei o immediatamente successivi agli interventi dell'assistenza tecnica). Nel 2003 la stessa percentuale di macchine ha invece eseguito almeno il 60% dei controlli previsti (il 66% ha eseguito più dell'80% dei controlli previsti) mettendo in evidenza problemi di cattiva gestione strumentale.

004

FREE SOFTWARE BASED WEBREPORTING PER SISTEMI GESTIONALI ITALAB C/S ® E UNITECH POWERLAB ®

Bianchi P.

Az. Ospedaliera della provincia di Pavia, Dip. di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi PO di Stradella, STRADELLA (PV)

La consultazione online dei referti in tempo reale da anni non è più una novità; ma solo da quando la tecnologia di Internet si e' diffusa capillarmente in ospedali, corsie e ambulatori essa ha assunto valenza strategica, popolarità e praticabilità. Descrivo un sistema software che, prelevando le informazioni da due diffusi applicativi commerciali con architettura client/server, ci ha permesso di introdurre in ospedale il webreporting (consultazione esami mediante browser e pagine web da qualunque PC) senza oneri economici, dato che si basa interamente su programmi "free software" di libera distribuzione.
Webreporting da Italab c/s ®: Italab c/s, prodotto da Dianoema Spa (Bologna), e' stato in uso nel nostro laboratorio dal 1999 al 2003 in versione standard 3.4. L'applicazione di webreporting e' stata sviluppata per risolvere due problemi: 1) migliorare il TAT in urgenza, che monitorato quotidianamente nell'arco di 4 anni mostrava una tendenza media al calo del 19% annuo, ma non riusciva più a scendere sotto i 50 minuti 2) risolvere il problema della consultazione degli esami storici meno recenti, che Italab scarica su file offline di macchinosa riattualizzazione. Mediante la procedura online l'utente accede al webserver del laboratorio, si accredita e può decidere se consultare gli esami in corso o quelli storici; può operare la ricerca per reparto o per paziente; ottiene l'elenco delle richieste del reparto o del paziente e ne può visualizzare gli esiti. Di ogni operazione compiuta viene tenuta debita traccia. L'applicazione mantiene attrattive per i laboratori che ancora operano con Italab tradizionale (Dianoema offre peraltro una completa soluzione gestionale web based).
Webreporting da Powerlab ®: Nel 2003 l'intero dipartimento di laboratorio della nostra azienda ha migrato verso Powerlab, prodotto da Unitech Srl (Milano). E' stato rapidamente effettuato il porting della applicazione di consultazione via web alla nuova piattaforma, esteso a tutti i laboratori del dipartimento.
Conclusioni: La consultazione via web e' molto popolare e gradita ai reparti, in particolare a quelli chirurgici che hanno rapidamente e finalmente abolito le pseudo urgenze. Nel 2003 si sono avuti in media 217 accessi mensili, nei primi due mesi 2004 in media 354.
Caratteristiche tecniche: Applicazioni web sviluppate in casa e installate sul server web di laboratorio, avente le seguenti caratteristiche: piattaforma Intel, sistema operativo Linux, webserver Apache, database Mysql, cliente Oracle per Linux (distribuzione gratuita), pagine in HTML, script php, librerie php Oracle e Mysql. L'autore rende disponibili istruzioni per la configurazione del sistema e il codice sorgente delle pagine che implementano l'applicazione specifica.

005

UNA APPLICAZIONE WEB BASATA SUL FREE SOFTWARE PER LA SORVEGLIANZA DELLA TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE.

Bianchi P.

Az. Ospedaliera della provincia di Pavia, Dip. di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi PO di Stradella, STRADELLA (PV)

La sorveglianza della terapia anticoagulante orale (TAO) e' una importante occasione per qualificare in senso clinico l'attività del laboratorio analisi, il quale può far valere i suoi vantaggi posizionali (vede e parla con la maggior parte dei pazienti, ha una visione d'assieme dei risultati, può decidere approfondimenti diagnostici). Presento una applicazione informatica per la sorveglianza TAO sviluppata in casa su piattaforma web.
Caratteristiche applicative:
- in ambulatorio prelievi, emette una scheda anamnestica non appena il paziente ha eseguito l'accettazione amministrativa. Quando il paziente viene chiamato, il medico ha già preso visione dei suoi INR con le annotazioni precedenti, e può discutere consapevolmente sulla terapia seguita e il suo stato clinico.
- in laboratorio, a fine routine, il programma estrae dal gestionale gli INR del giorno e consente di annotare caso per caso il giudizio clinico sull'andamento e la prescrizione terapeutica per il periodo successivo. Al termine viene emesso un referto grafico. La valutazione sull'andamento e la prescrizione della nuova dose sono, per precisa scelta, immesse a mano e decise esclusivamente dall' operatore umano.
- presso distretti, ambulatori e altri laboratori dell'Azienda tutti collegati in rete intranet, permette la consultazione delle cartelle cliniche e l'introduzione di informazioni cliniche note a curanti e specialisti.
- funzioni ancillari permettono la manutenzione degli archivi, il CQI dell' INR, la redazione di statistiche descrittive e la segnalazione di nuovi pazienti con più INR consecutivamente elevati e arruolabili dal Centro.

Caratteristiche tecniche:
Applicazione web (lavora via browser da qualunque postazione in rete intranet). Si interfaccia con gli applicativi commerciali Italab c/s (Dianoema) e Powerlab (Unitech). L'applicazione fa seguito ad analoga collaudata applicazione client/server in Access97. E' 'stata sviluppata sul server web di laboratorio, avente le seguenti caratteristiche: piattaforma Intel, sistema operativo Linux, webserver Apache, database Mysql, cliente Oracle per Linux (distribuzione gratuita), pagine in HTML, script php, librerie php Oracle e Mysql.

Sono disponibili istruzioni per l'integrazione del sistema a partire dalle componenti "free software" di libera ridistribuzione, e il codice sorgente delle pagine che implementano l'applicazione specifica.

006

UNA BASE DI DATI CLINICI E DI LABORATORIO PER LO STUDIO DEL DEFICIT DI GLUCOSIO-6-FOSFATO - DEIDROGENASI

Caforio M.P[1] Maffi D[1]., Knijn A[2]., Caprari P[1]., Pasquino M.T.[1], Cianciulli P[3]., Sorrentino F.[3], Roazzi P[2]., Di Benedetto C[2]., Salvati A.M.[1].

[1]Dipartimento di Ematologia,Oncologia e medicina Molecolare, [2]Servizio Informatico, Biblioteca, Attività Editoriali, Istituto Superiore di Sanità, Roma. [3]Day Hospital Talassemici, Ospedale S. Eugenio, Roma

IL deficit di Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è una malattia genetica, con ereditarietà legata al sesso, ed una marcata eterogeneità degli aspetti clinici e di laboratorio. La manifestazione clinica principale è l'anemia emolitica e la sua gravità è legata alla variariabilità del difetto molecolare ed alla presenza di fattori che scatenano l'emolisi (farmaci, fave, infezioni, età neonatale). La diagnosi definitiva si ottiene applicando un protocollo di indagine comprensivo di studio familiare,saggi enzimatici ed analisi molecolare.
Obiettivo. Sviluppo di un sistema computerizzato per la raccolta e l'elaborazione dei dati clinici e di laboratorio di pazienti con deficit di G6PD.
Struttura della base di dati La base di dati è formata in moduli di informazioni omogenee: anagrafiche, cliniche, di laboratorio, di follow-up. Ciascun modulo contiene sottoinsiemi di dati strutturati in liste di riscontro che permettono di standardizzare la raccolta di informazioni e di eliminare le ridondanze. Il modulo dati clinici comprende quattro sottoinsiemi di informazioni: anamnesi familiare, anamnesi patologica, esame obiettivo e terapia; il modulo di laboratorio comprende tre sottoinsiemi di dati: ematochimici, biochimici e molecolari. Le informazioni vengono memorizzate in una base di dati relazionale centralizzata da cui possono essere richiamate e presentate, mediante un'interfaccia grafica, nella forma di una cartella clinica tradizionale. Il software di interfaccia è stato realizzato utilizzando Microsoft Access 2000. L'accesso al programma avviene mediante un browser di internet. La riservatezza è garantita da una coppia utente/password. Oltre all'archiviazione, il software consente elaborazioni statistiche elementari, esportazione di dati in diversi formati per analisi statistiche più approfondite.
Conclusioni. La base di dati così strutturata permette di raggiungere diversi obiettivi: i) accesso veloce ed organizzato ad una grande quantità di informazioni riguardo al paziente,ii) standardizzazione dell'approccio diagnostico e clinico,iii) condivisione delle informazioni con altri centri di diagnosi e cura. La stessa base di dati rappresenta uno strumento per lo studio delle relazioni tra aspetti clinici e biochimico-molecolari e potrebbe essere utilizzata per l'allestimento del registro nazionale del deficit di G6PD.
Bibliografia. A.M.Salvati, D.Maffi, P.Caprari, M.T.Pasquino, M.P.Caforio, A.Tarzia. Deficit di glucosio-6- fosfato deidrogenasi ed anemia ereditaria. Annali Istituto Superiore di Sanità, 35: 193-203,1999.

007

VERIFICA DI ALCUNI INTERVALLI DI RIFERIMENTO (I.R.) CON IL METODO INDIRETTO SU 22882 PAZIENTI: CONSIDERAZIONI E PROSPETTIVE

Autori:
Schinella M., Torboli M., Giordani E., Valentini A.°

Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine, Rovereto.
°Servizio di Fisica Sanitaria; APSS- Trento.

Introduzione
L'obiettivo del lavoro è la verifica degli I.R. di Colesterolo Totale (CT), Colesterolo HDL (HDL) e Trigliceridi (TRIG) nella popolazione afferente al laboratorio dell' ospedale di Rovereto. Viene utilizzato il metodo indiretto o a posteriori, che a differenza del diretto, prevede l'individuazione di una popolazione con un numero elevato di campioni, (>2000), e l'applicazione dei criteri di ripartizione ed esclusione.
Materiali e Metodi
Mediante software dedicato, sono stati trasferiti dai computer degli strumenti di biochimica i dati dei test eseguiti dal 1997 al 2001 successivamente elaborati con il programma Excel della Microsoft. La verifica della differenza tra due classi è stata effettuata con il test della deviata standardizzata. Abbiamo considerato i valori di CT, HDL e TRIG. Le determinazioni sono state eseguite su analizzatore Roche Hitachi 917 con le metodiche standard della ditta produttrice. Il laboratorio utilizza i seguenti valori decisionali: CT <190 mg/dL; HDL: m: >39 mg/dL, f: >43 mg/dL; TRIG: <180 mg/dL.
Risultati
Per quanto riguarda il CT, il 68% delle 22882 determinazioni presenta concentrazioni superiori a 190 mg/dL con una differenza tra pazienti degenti ed esterni, che risulta significativa al test della deviata standardizzata (z=42,2; z*=29,1) con valori medi inferiori nei pazienti ricoverati rispetto ai pazienti ambulatoriali. Suddividendo il campione in fasce di età, appare chiaro che i livelli di CT e TRIG crescono con l'aumentare dell'età. Suddividendo la popolazione dei pazienti esterni in base al sesso, è invece significativa la differenza per HDL (z=37,3; z*=20,9), per il quale già esistono dei valori desiderabili diversi per i due sessi.
Conclusioni
Con il metodo indiretto si ha la certezza che la verifica/determinazione degli intervalli di riferimento si ottiene processando i campioni nello stesso modo utilizzato per ottenere i risultati dei pazienti, senza prestare la particolare cura che si deve usare nella determinazione dei valori degli individui di riferimento, disponendo inoltre di una massa di dati impensabile fino a qualche anno fa.
Dalla nostra esperienza si può dedurre che si possono ottenere non solo intervalli di riferimento più accurati, ma anche "fotografie dello stato di salute" della popolazione afferente al laboratorio, utile per eventuali programmi di educazione sanitaria e/o approfondimenti clinici di singole patologie o fattori di rischio.

008

SISTEMA PREANALITICO APERTO: L'ESPERIENZA DELL'OSPEDALE DI CREMONA

Bassi L.,Caroli S., Castellani V., Ferrari F., Rizzardi S., Sarzi Amadè A., Vescia S.*

Azienda Istituti Ospitalieri
Laboratorio Analisi - * Centro Immunotrasfusionale Cremona

L'organizzazione del nostro laboratorio prevedeva l'uso di provette primarie per la gestione degli esami sia in modo automatico sia manuale. Ciò comportava, in alcuni casi, l'uso per ogni paziente di un elevato numero di provette con prelievo di parecchio sangue e difficoltà di raccolta in situazioni difficili. Per cercare di risolvere questo problema è stato introdotto un sistema preanalitico aperto (Pathfinder – Medical Systems) che soddisfa non solo le esigenze del Laboratorio Analisi, ma anche quelle del Centro Immunotrasfusionale facente parte del medesimo Dipartimento.
Il sistema consente la centralizzazione della raccolta e trattamento dei campioni di siero, la corretta attribuzione delle provette figlie mediante bar-code uguale alla provetta madre, il controllo del volume di siero con individuazione dei coaguli, la completa rintracciabilità in ogni fase, l'archiviazione unica dei campioni, la sicurezza nell'operatività e per l'operatore.
La nostra situazione prevedeva in chimica clinica:
1 madre per Immulite 2000 (marcatori, tiroide, fertilità)
1 madre per Hydrasis (Sebia) per elettroforesi
1 madre per ALP isoenzima osseo
1 madre per immunofissazione
Dopo l'introduzione del sistema preanalitico una sola madre, peraltro di dimensioni ridotte rispetto alla precedente (7 ml invece di 10 ml), soddisfa tutti questi esami.
Considerando le richieste dei pazienti afferenti al laboratorio in una settimana, si è osservato che la nuova organizzazione consente un risparmio di materiale prelevato e una riduzione del numero di provette da gestire pari al 13.5%. Inoltre, grazie alla riduzione del numero di provette si effettua lo stoccaggio delle madri fino al giorno seguente invece che eliminarle in giornata.
La nuova organizzazione ha richiesto la collaborazione di tutti i tre settori che, utilizzando il sistema, forniscono il personale necessario alla gestione quotidiana. E' stato anche necessario riassegnare il personale ai diversi posti di lavoro per coprire la nuova esigenza. I tempi di lavoro, nonostante un modesto rallentamento nell'arrivo dei campioni sugli strumenti, non hanno comportato un ritardo nella refertazione. L'esperienza è molto positiva ed è previsto un ampliamento nell'uso del sistema, anche per il vantaggio offerto dal gestire provette figlie già sierate e smistate.

009

INTRODUZIONE DI NUOVI TESTS DIAGNOSTICI: PROPOSTA DEL GRUPPO EVIDENCE BASED LABORATORY MEDICINE EBLM SIBIOC.

Per il gruppo EBLM-SIBioC: P.Pezzati * Brogioni M.° e Trenti T. §

*Lab. Sanità Pubblica ASL10 Fi °Lab.Analisi AO Careggi Fi § Servizio Patologia Clinica AUSL Mo

Il rapporto tra EBM e medicina di laboratorio è stato definito (Price CP Clin Chem 2000 46 1041-50) come un processo continuo composto da quattro elementi: 1)l'identificazione del quesito diagnostico 2)la selezione critica delle migliori evidenze presenti in letteratura 3)l'adozione nella attività di routine della migliore procedura 4) il mantenimento della migliore procedura possibile. In particolare, l'uso di un test diagnostico può essere considerato a tutti gli effetti un intervento diagnostico, e di conseguenza esso deve essere richiesto esclusivamente in presenza di un chiaro quesito clinico, e dell'evidenza che il risultato possa dare un valido contributo alla soluzione del quesito (Trenti T Clin Chim Acta 2003 333 155-167). Partendo da questa osservazione, il gruppo EBLM SIBioC, nell'ambito del corso di formazione "La Medicina di Laboratorio basata sulle prove di efficacia o EBLM" (Rimini 19-20 novembre 2003), ha elaborato un documento il cui scopo è tradurre in pratica i principi esposti. Si tratta di una griglia composta da 25 domande organizzate in 5 gruppi, relativi a: 1) modalità organizzative 2) situazioni di applicazione del test 3) caratteristiche tecniche del test 4) potere diagnostico del test 5) valutazione dell'impatto dell'introduzione del test nella routine. Il I set di domande chiarisce: modalità di richiesta del test (urgenza/routine; test aggiuntivo/test sostitutivo di altra analisi); finalità (diagnosi/ricerca); matrice biologica (sangue/urnine/ altro); eventuali modalità di prelievo; cadenza di richiesta analitica (intervallo di tempo/ingresso/ dimissione/altro); TAT ottimale e previsione del numero di tests/mese. Il II set di domande riguarda: tipologia di pazienti; clinical setting; prevalenza della patologia allo studio; dati di variabilità biologica. Il III gruppo di domande esamina le caratteristiche tecniche del test, in particolare: metodologia analitica; sensibilità e specificità analitica; valori di riferimento; errore totale accettabile; interferenze note. Il IV blocco di quesiti indaga in modo specifico le caratteristiche di accuratezza diagnostica del test (sensibilità, specificità, LR pos e neg, curva ROC, valore predittivo pos e neg). Infine, nell'ultimo gruppo di domande, vengono presi in considerazione elementi per la valutazione sia dell'outcome clinico che del rapporto costi-benefici; viene inoltre richiesta la bibliografia essenziale per la valutazione della forza delle evidenze. La griglia non è stata concepita come un modulo da compilare, a cura del clinico, per attivare una prassi burocratica, ma come strumento di confronto e di crescita culturale per il clinico ed il laboratorista, allo scopo di porre le basi di una modalità di lavoro improntata ad una maggiore consapevolezza e razionalità delle scelte operative.

010

EFFICACIA DI UNO STRETTO MONITORAGGIO DEL TAT SUL MIGLIORAMENTO DELL'EFFICIENZA DELLE URGENZE DI LABORATORIO.

Marigo B., Facchinato V., Babetto E., Di Vitofrancesco N., Scarati S., Carraro P.

Laboratorio d'Urgenza, Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, via Giustiniani 2, 35100 Padova

PREMESSA: Svariate esigenze cliniche richiedono l'esecuzione sempre più tempestiva delle analisi di laboratorio. La misura di questa velocità con opportuni indicatori statistici si definisce controllo del Turnaround Time (TAT). OBIETTIVO: Valutare l'influenza di un sistematico monitoraggio quotidiano del TAT sulla velocità di risposta delle analisi urgenti. CONTESTO: Laboratorio Urgenze del Servizio di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Italy). MATERIALI E METODI: Nel nostro laboratorio esiste dal 1998 un sistema informatizzato di misura settimanale del tempo di risposta intralaboratorio di tutte le richieste con potassio (analita traccia scelto per la sua importanza clinica, frequenza e necessità di pretrattamento del campione). Questo ha reso possibile seguire l'evoluzione del tempo di risposta in funzione delle modificazioni organizzative e strumentali che nel corso degli anni si sono succedute. E' stato così possibile osservare come alcune operazioni di consolidamento strumentale non abbiano inciso sul TAT, mentre un notevole progresso è stato ottenuto con l'introduzione di un software di gestione del processo chiamato Assolo , in grado di monitorare, minuto per minuto, lo stato di avanzamento delle analisi ed eventuali ritardi. Fra le modifiche introdotte più recentemente figura il monitoraggio quotidiano del TAT. Il report viene affisso nella bacheca del laboratorio ed è di immediata consultazione per tutto il personale. Riporta, giorno per giorno, oltre alla misura del TAT, anche il carico di lavoro ed eventuali problemi tecnici occorsi. RISULTATI: La semplice introduzione del monitoraggio giornaliero del TAT ha permesso di ottenere un miglioramento nel tempo di risposta valutabile in 5-10 minuti. CONCLUSIONI: I risultati ottenuti mostrano come le misura delle variazioni organizzative sia un'ottima strategia nel processo di miglioramento continuo della qualità. Inoltre, un più preciso controllo del processo da parte di tutti gli operatori migliora l'efficienza.

BIBLIOGRAFIA: Carraro P, Plebani M. Process control reduces the laboratory turnaround time. Clin Chem Lab Med. 2002 Apr;40(4):421-2.

011

CHECK-LIST PER UTILIZZO A CICLO CONTINUO NELLE 24 ORE DEL SISTEMA ROCHE MPA-MODULAR PPE/ISE1800

Gasparrini A., Santini G., G. Lai

Laboratorio Analisi Ospedale Madonna Del Soccorso. San Benedetto Del Tronto

Scopi/obiettivi Definizione delle modalità di utilizzo del sistema per permettere l'esecuzione nell'arco delle 24 ore del gruppo di analiti consolidati affluenti in continuo (routine ed urgenze) .
Metodologia sono state definite l'insieme delle procedure e delle istruzioni operative suddivise per singole attività ed operatore
Risultati La check-list è stata composta suddividendola rispetto ai turni di presenza degli operatori (tecnici e dirigenti responsabili della linea operativa), alle competenze degli stessi ed alla necessità di interrompere il processo analitico il meno possibile per manutenzione ordinaria. La lista comprende : - modalità di calibrazioni – modalità di esecuzione dei controlli – modalità di esecuzione – modalità di validazione dei risultati – modalità di comunicazione con il sistema PSM –modalità di gestione dei reagenti - modalità di manutenzione periodica (giornaliera – settimanale –mensile –annuale). La lista è stata applicata a partire dal marzo 2003 e periodicamente aggiornata rispetto all'implementazione del sistema. Attualmente si presenta nella versione illustrata nel poster.
Considerazioni conclusive . La Check-list permette nella nostra esperienza , pur nella sua complessità, la perfetta standardizzazione del processo analitico con coinvolgimento di 12 tecnici interscambiabili sulla postazione di lavoro nonché quello dei 6 dirigenti addetti a turno al controllo della linea operativa. Ciò è stato possibile anche mediante adeguato iter formativo in loco. L'utilizzo nell'arco delle 24 ore non crea problemi e permette di utilizzare metodiche e strumenti identici per la routine e le urgenze abbattendo una possibile variabilità analitica.
Bibliografia Il Laboratorio Analisi nelle "ISO 9000" ed oltre:guida pratica. M.R. Cavallo ed altri , Biomedia source books

012

RICAVO PER PRESTAZIONI DIAGNOSTICHE IN UN'AZIENDA SANITARIA DI NOTEVOLE COMPLESSITA'

Lupo T., Palmieri D., Pascucci I., De Vendittis E.

Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, Napoli

In Aziende Sanitarie pubbliche di notevole complessità la contabilità analitica [1] è principalmente riferita all'incidenza sulla spesa sanitaria di patologie che necessitano di ricovero ospedaliero, mentre le prestazioni di laboratorio sono valutate come costi funzionali al trattamento delle patologie e non come ricavi della gestione economica delle Aziende.
Scopo di questo studio è la valutazione del ricavo delle prestazioni erogate dal Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio (DAsMeLab) a favore dei pazienti ricoverati in regime ordinario o di 'day hospital' presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II (AOU) della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Napoli.

Lo studio è stato affrontato applicando una procedura statistica basata sull'andamento reale dei dati relativi al mese di Giugno 2003, considerato come mese rappresentativo dell'andamento dell'attività analitica del DAsMeLab nel corso dell'anno e dell'incidenza delle varie strutture dell'AOU sul valore globale delle prestazioni richieste. Dopo aver raggruppato i 266 tipi di prestazioni in 16 linee analitiche, è stata calcolata l'incidenza di ciascuna prestazione sulla numerosità totale della linea analitica. L'incidenza è stata poi moltiplicata per la tariffa della singola prestazione prevista dal Nomenclatore Tariffario approvato dalla Giunta Regione Campania il 31.3.1998. Si è così determinato il costo medio di una prestazione per ciascuna linea analitica, ponderando le differenti tariffe con la diversa incidenza. Per alcune linee analitiche, in cui c'è scarsa numerosità di indagini o non c'è diversificazione tariffaria, è stato invece applicato il costo unitario della singola prestazione. I costi medi/unitari, oltre a consentire la valorizzazione delle diverse linee analitiche, hanno permesso di valutare l'incidenza delle varie strutture dell'AOU sul valore globale delle prestazioni richieste.

A seguito dell'analisi effettuata la valorizzazione delle prestazioni eseguite nel mese di Giugno 2003 è risultata di Euro 876.951 a fronte di 296.428 prestazioni richieste. Utilizzando la stessa procedura statistica, è stato possibile determinare che il ricavo delle 3.413.376 prestazioni erogate dal DAsMeLab per le strutture dell'AOU nell'anno 2003 è stato di Euro 10.075.716. Nell'ambito delle diverse linee analitiche la maggior incidenza sul ricavo è rappresentata da un pannello di Indagini routinarie di Biochimica Clinica (51.7%), seguito da un pannello di Indagini Urgenti (23.8%).

In conclusione, il ricavo complessivo determinato per l'anno 2003, oltre a coprire i costi calcolati dal Servizio di Gestione Economico Finanziaria dell'AOU per l'intero processo produttivo del DAsMeLab, consentirebbe di ipotizzare un utile di circa il 50% rispetto ai costi sostenuti.

1. Borgonovi E. Il controllo economico nelle aziende sanitarie, EGEA, Milano, 1990

013

PROPOSTA DI UN MODELLO ORGANIZZATIVO FUNZIONALE DI LABORATORIO TRA SEDI DIVERSE

Montani A.N.

Dipartimento Patologia Clinica, Ospedale Civico, Via Fleming 1, 26841 Casalpusterlengo, LO

Un recente modello (1), dopo un'approfondita disamina dell'evoluzione tecnologica del laboratorio analisi e della situazione organizzativa attuale, indica come possibile soluzione un'integrazione di tecnologie e la creazione di un core-lab supportato da tre laboratori di base per ridurre i costi, utilizzare al meglio il personale ed ottimizzare la strumentazione occorrente.
Il modello proposto ha, a mio avviso, la peculiarità di attagliarsi, in modo specifico, ad un ospedale di dimensioni medio-grandi con la possibilità di razionalizzare diversi flussi, al momento, tra loro separati; non ritengo sia oggi adattabile alla situazione logistica in cui si trova l'Azienda Ospedaliera della Provincia di Lodi.
Tutta la diagnostica è parcellizzata su quattro ospedali in un raggio di circa 30 Km; si tratta di attività replicate sia per la routine che per le urgenze. Ciò comporta inevitabilmente un incremento di spesa, una cattiva distribuzione del personale e notevoli difficoltà di collegamento per assenza di trasporti dedicati.
E' in corso un tentativo di razionalizzazione che prevede due sedi principali di laboratorio con due laboratori satellite e che incontra grandi ritardi per questioni logistiche, informatiche e culturali.
Il Dipartimento di Patologia Clinica che comprende l'Anatomia Patologica, la Citogenetica, il SIT e tutte le strutture di laboratorio dell'Azienda, certificato ISO 9001 dal 2002 per queste ultime, non potrebbe comunque ottimizzare tutta l'attività proprio per la residua suddivisione e per le carenza summenzionate.
Se e quando si dovessero risolvere i problemi relativi ai collegamenti siano essi di tipo meccanico che informatico, la specializzazione di ogni laboratorio potrebbe consentire una più oculata gestione di tutte le risorse.
L'attivazione di laboratori monotematici, ognuno con le rispettive urgenze, consentirebbe un efficace risparmio di tempo e costi con un'integrazione di tecnologie, personale ed esperienze. La connessione informatica con una rete interna e la predisposizione di trasporti dedicati (esigenze che non mi sembrano oggi insuperabili) consentirebbe al Dipartimento di fornire una risposta completa, rapida, "controllata" e "normalizzata", in altre parole "standardizzata" che non potrebbe che rispondere alle esigenze del "cliente" e non presterebbe il fianco ad antipatici ma inevitabili confronti spesso fuori luogo.
Una soluzione come quella proposta potrebbe essere posta in atto in tempi brevi se si privilegiasse la logica e la funzionalità.

1) Franzini C. et al., Biochim.Clin., 27,239,2003

014

ESPERIENZA TERRITORIALE DI MANAGEMENT DI LABORATORIO

Tani M., Cocchi G., Pedroni P., Milanesi B.*

Servizio di Patologia Clinica A.O. "Desenzano del Garda"
Località Montecroce - Desenzano del Garda (BS)

* Direttore Prof. B.Milanesi

Il 1°gennaio 1998 nasce l'Azienda Ospedaliera "Desenzano del Garda" nella quale si accorpano i Presidi Ospedalieri di Desenzano/Lonato, Gavardo/Salò, Manerbio/Leno in ottemperanza a quanto previsto dalla L.R. n.31 dell'11.07.1997.
Dalla sola osservazione della carta geografica s'intuiscono la difficoltà, gli scopi, gli obiettivi del nostro lavoro che in cinque anni d'attività ha consentito di uniformare realtà che per tradizioni, usi, costumi provenivano da diverse esperienze organizzative.
Inoltre, in considerazione dell'estrema vastità del territorio interessato, è stato necessario continuare a soddisfare, mantenere, ampliare le richieste dell'utenza sul territorio.
Il nostro principale obiettivo è stato la realizzazione dell'integrazione dei Servizi di Medicina di Laboratorio nella neonata Azienda Ospedaliera rispettando i vincoli derivanti dalla collocazione geografica, dalle diverse culture, dalle diverse esperienze e professionalità.
Si è voluto dimostrare come una "buona sanità", intesa come Diagnostica di Laboratorio, si possa ottenere anche in una struttura pubblica, organizzando ciascuna "cultura" in modo tale da renderla fruibile ai fini di un'elevata produttività.
Il progetto è stato realizzato utilizzato uno strumento gestionale d'impresa il "benchmarking", ovvero un confronto tra le diverse realtà, è stata confrontata la contabilità dei costi e dei ricavi, utilizzando la metodologia del calcolo del costo di produzione, confrontando alcuni esami/settori delle differenti realtà laboratoristiche.
Gli scopi del presente progetto sono stati:

- Acquisire per ciascuna realtà una conoscenza della relazione tra attività svolta e risorse assorbite, ossia rispondere alla domanda chi siamo?
- Mettere a confronto i costi d'alcuni settori, pur nella consapevolezza dell'eterogeneità organizzativa e funzionale esistente, ossia rispondere alla domanda come rispondiamo e come siamo posizionati al territorio di riferimento?
- Formulare ipotesi di miglioramento economico e/o qualitativo derivanti dal benchmarking, ossia rispondere alla domanda dove bisogna andare?

tutto questo interagendo con tutte le strutture aziendali interessate (Controllo di Gestione, Rilevazione prestazioni ambulatoriali, Provveditorato, Personale).
L'organizzazione attuale prevede l'esistenza di tre

014

Laboratori di Presidio (Desenzano, Gavardo, Manerbio) cinque punti prelievo Ospedalieri (Desenzano, Gavardo, Salò, Manerbio, Leno) e 22 punti prelievo territoriali.
Nel corso degli anni sono stati eliminati dei primariati (da 4 a 1) concentrando Laboratori, istituituendo Unità Operative Semplici, ogni Laboratorio di Presidio ha un suo responsabile afferente al Dirigente di Stuttura Complessa, con un'organizzazione di tipo dipartimentimentale.
E' stato inoltre abolito il turnover dei pensionamenti risparmiando 4 Laureati e 8 Tecnici, tale strategia ha consentito di ridurre il costo del personale, che rappresenta ora il 50% dei costi diretti a fronte di un costo medio aziendale del 70%.
Per quanto riguarda lo scenario futuro, tra le diverse ipotesi che potrebbero essere individuate: outsourcing, point of care, esamificio, consolidamento, concentreremo i nostri sforzi sul consolidamento, attraverso un potenziamente della realtà preanalitica attingendo sempre più alle nuove tecnologie che stanno mostrando, riscontri positivi per importanti aspetti della nostra attività quotidiana.

Bibliografia

AA.VV., Redazione a cura di G.Caliendo
Fare benchmarking in sanità
Agenzia Sanitaria Regionale. Clueb, 1998.

Antonello Zangrandi
Amministrazione delle aziende sanitarie pubbliche
Giuffrè Editore 1999 ISBN 88 14 07679 0

015

DIFFICULTIES IN THE PLASMINOGEN GENE MUTATION ANALYSIS IN PATIENTS WITH LIGNEOUS CONJUNCTIVITIS.

Saggiorato G.*; Pellati D.*; Granzotto M.[‡]; Dal Bello F.[§]; Spiezia L.*; Lombardi A.M.*; Sartori M.T.[*]

Department of Medical and Surgical Sciences, [*]2nd Chair of Internal Medicine, [‡]3rd Chair of Internal Medicine; [§]Department of Histology, Microbiology and Medical Biotechnology; University of Padua; Italy

Ligneous conjunctivitis (LC) is a rare disease, caused by absent or very low plasminogen levels. It is characterized by the growth of fibrin-rich pseudomembranes on mucosa surfaces. Several mutations in the plasminogen gene have been found in patients with LC (Schuster et al., 2001). A number of genes homologous to the gene for plasminogen, which is located on chromosome 6, have been identified. While performing a genetic analysis of plasminogen gene in two patients with severe hypoplasminogenemia and LC, we found a heterozygous 14-bp deletion in the sequence of the amplified exon 5, leading to a TGA stop codon 40 bp downstream of the deletion site. The same deletion, was also detected in healthy controls, so we suspected for an homologous gene coamplification. On DNA extracted from peripheral WBC, plasminogen gene exon 5 was amplified by PCR method using specific primers reported in literature (Azuma H. et al., 1993), and the PCR products were analyzed by automated DNA sequencing. The exon 5 amplicon was run on 3% agarose-NuSieve gel for 3 h, and three different bands of 234, 220, and 206 bp, respectively, were obtained. A multiple bands pattern also appeared by PstI restriction enzyme analysis of the same amplicons; moreover the single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) showed an atypical single and double stranded DNA pattern even in healthy control. The 206-bp product sequence, which showed the aforementioned 14 bp deletion and other three single nucleotide substitution, disclosed a complete identity with a plasminogen like sequence on chromosome 2 (2p11-q11). The PCR procedure was modified in order to improve the primers amplification specificity. A final 12 °C increase in the annealing temperature allowed to obtain only the 220 bp band, which confirmed the 100% identity with plasminogen gene exon 5 sequence, and no nucleotide variations were seen in patients. The study of plasminogen gene mutations is strongly complicated by interferences with both plasminogen related and plasminogen-like genes. The identification and elimination of coamplified homologous sequences is the first and the essential step to correctly analyze the plasminogen gene sequence in order to avoid false positive results in the genetic diagnosis of LC.

016

RUOLO DELLA E-SELECTINA NELLA PATOGENESI DELL'ANEURISMA AORTICO ADDOMINALE

Cecchini F*., La Torre A.*, Biondi M.L.*, Ghilardi G.**, Guagnellini E.*

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Az. Osp. San Paolo, Milano**;**
**Clinica Chirurgica Università degli Studi di Milano

Le molecole di adesione partecipano all'interazione tra leucociti e endotelio e giocano un ruolo fondamentale nella formazione delle placche aterosclerotiche. Gli aneurismi dell'aorta addominale (AAA) nei paesi industrializzati hanno una prevalenza del 10%. La rottura di tali aneurismi costituisce circa il 4% dei decessi nei soggetti con più di 65 anni. Le selectine fanno parte delle molecole di adesione; a questa classe appartengono la L-selectina che è prodotta dai leucociti, la P-selectina che è prodotta dalle piastrine e la E-selectina che è espressa dalle cellule endoteliali entro 2-8 ore dalla loro attivazione. Elevati livelli di E-selectina sono stati riscontrati sulla superficie endoteliale delle lesioni aterosclerotiche. Recentemente è stata descritta la relazione tra il polimorfismo S128R nella regione EGF-like domine della E-selectina e il rischio di aterosclerosi giovanile.
Scopo di questo lavoro è di valutare la distribuzione del polimorfismo S128R della E-selectina nei pazienti con AAA verso la popolazione di controllo. Inoltre abbiamo indagato la distribuzione dello stesso polimorfismo nei pazienti giunti all'osservazione per rottura dell'aneurisma, emergenza chirurgica che può comportare una elevata mortalità (R), verso quei pazienti portatori di AAA in eventuale attesa di intervento chirurgico in elezione (NR).
A tale scopo sono stati considerati 139 soggetti per la popolazione di controllo e 77 pazienti con aneurisma aortico addominale di cui 23 rotti e 54 non rotti.
Dalla nostra indagine abbiamo notato che nei pazienti AAA il genotipo Ser/Ser è meno frequente: Ser/Ser 110 vs 52, Ser/Arg 28 vs 23, Arg/Arg 1 vs 2 [controlli vs AAA: OR 1.82 (C.I. 0.92 – 3.57) p=0.02].
All'interno della classe dei pazienti con AAA si nota una diversa distribuzione tra i pazienti con aneurisma rotto verso i pazienti con aneurisma non rotto: in particolare nei pazienti con rottura dell'AAA si osserva una significativa aumentata presenza dell'allele Arg: Ser/Ser 11 vs 41, Ser/Arg 11 vs 12, Arg/Arg 1 vs 1 [rotti vs non rotti: OR 3.44 (C.I. 1.08 – 10.87) p=0.0159].
In conclusione, il nostro lavoro suggerisce che la presenza dell'allele Arg potrebbe essere associata ad una maggior severità della patologia dell'aneurisma dell'aorta addominale e pertanto è da considerarsi come un possibile fattore prognostico nella stadiazione iniziale della malattia.

017

SIGNIFICATO PREDITTIVO DELLE ALTERAZIONI MOLECOLARI DELL'ENZIMA MTHFR NELLA CARDIOPATIA ISCHEMICA.

Bianchi L., Venturi C., Botoni M., Vergoni W.

Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Pescia (PT).

Sempre più frequenti sono in letteratura le segnalazioni dell'esistenza di una correlazione tra i livelli di omocisteina (Hcy) e la presenza di patologia cardiovascolare.
Obiettivi. Essendo l'N-5,10-metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) un'enzima chiave del metabolismo dell'Hcy abbiamo voluto verificare se le mutazioni più frequenti di tale enzima fossero coinvolte nella variazione dei livelli di Hcy e se correlassero con la presenza di cardiopatia ischemica.
Metodologia. E' stata selezionata una popolazione composta da un gruppo di 95 pazienti in fase acuta per malattia coronarica acuta (CAD) ed uno di 80 pazienti di controllo sani, sovrapponibili per età, distribuzione fra i sessi ed incidenza dei fattori di rischio tradizionali. Sono stati determinati i livelli di Hcy con metodo immunologico a fluorescenza con luce polarizzata, (FPIA, Abbott) e le due mutazioni dell'enzima MTHFR: la C677T con reazione a catena della polimerasi (PCR) ed impiego dell'enzima di restizione, HinfI (Diatech); la A1298C con "Real Time" PCR ed analisi delle curve di melting (Rotor gene, Diatech). La gravità della malattia coronaria è stata definita utilizzando il Gensini Cardio Score (GCS).
Risultati. 1) I due gruppi sono risultati indistinguibili rispetto alle frequenze alleliche delle due mutazioni considerate (test del $\chi 2$: $p>0.05$); 2) la mutazione C677T risulta significativamente correlata ai livelli di Hcy ($p<0.01$, Anova-Bonferroni), con effetto dose genico, ma non alla presenza o gravità di CAD; 3) la mutazione A1298C non ha mostrato alcuna influenza sui livelli di Hcy, presenza e/o gravità di CAD; 4) i livelli di Hcy mostrano correlazione diretta ($p<0.01$; Anova-Bonferroni), verso la gravità, ma non con la presenza di CAD.
Conclusioni. I nostri dati indicano che: 1) soltanto la mutazione C677T è coinvolta nel metabolismo della metionina che determina iperHcy; 2) la presenza delle mutazioni C677T e A1298C non correla con la presenza o gravità della CAD; 3) la iperHcy correla con la gravità ma non con la presenza di CAD.
Bibliografia. Morita H., Taguchi J-I., Kurihara H. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. Circulation 1997; 95: 2032-2036.

018

DG-DGGE ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF C677T AND A1298C POLYMORPHISMS OF MTHFR GENE IN EPILEPTIC PATIENTS

Caccamo D., Condello S., Crisafulli G., Currò M., Pisani F.*, Ientile R.

Departments of Biochemical Sciences, and *Neurosciences–University of Messina, Messina

Studies of common polymorphisms of 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, C677T and A1298C, reported that compound homo- or hetero-zygotes for both mutations show significantly higher plasma total homocysteine (tHcy) levels compared to controls. Hyperhomocysteinemia is associated with excitotoxic damage present in several neurological diseases, such as Alzheimer, dementia and epilepsy.
The aim of this study was to investigate the frequency of MTHFR polymorphisms in epileptic patients compared to both subjects with various neurological disorders and healthy.
Patients with epilepsy (n=95), patients with various neuropathologies (n=66), and healthy individuals (n=50), were recruited for this study. Plasma tHcy was determined by HPLC using commercially available kit (BioRad, Italy). PCR products of exon 4, with relative intron 3' boundaries, and exon 7 of MTHFR gene, were evaluated for the presence of C677T and A1298C mutations by DG-DGGE (1) and sequence analysis.
Genotyping of epileptic patients revealed that MTHFR allele frequencies were 20% for heterozygotes CT677, 22% for homozygotes TT677, 14% for heterozygotes AC1298, and 8% for homozygotes CC1298. A 30% was represented by heterozygotes CT677T/AC1298C, while the remaining 6% included patients negative for both the mutations. Increased tHcy levels (33.02±4.0 μmol/L) were found among heterozygotes CT677 (30%), homozygotes TT677 (64%) and heterozygotes CT677/AC1298 (40%). Among patients with various neurological disorders, individuals heterozygous CT677/AC1298 and homozygous TT677 were the most abundant (21% and 28%, respectively). Further, genotype frequency was 13% for homozygotes CC1298, 9% for heterozygotes CT677 and heterozygotes CT677/homozygotes CC1298, and 5% for hetero-zygotes AC1298. Wild-type subjects were 9%. No significant difference was found for increased tHcy levels (35.7±11.6) compared to epileptic patients. Among healthy individuals, the prevalence of genotypes CT677 and AC1298 was 48% and 27%, respectively. However, tHcy was not significantly increased.
First we report that the association of C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR is highly frequent among epileptic subjects, and is a predisposing factor for high levels of tHcy. Finally, our data suggest the importance of a combined screening of both mutations to evaluate risk for hyperhomocysteinemia in epilepsy.

1) Cremonesi et al. (1997) BioTechniques

019

MODIFIED LONG DISTANCE PCR IN THE DETECTION OF INVERSION INTRON 22 IN SEVERE HEMOPHILIA A PATIENTS.

Cabrio L., Lombardi A.M., Granzotto M., Girolami A.

Department of Surgical and Medical Sciences 2° chair of Medicine,University of Padova Italy.

Hemophilia A is one of the most common bleeding disorders in man. It is caused by a large number of mutations in the factor VIII gene About half the family with a severe disease (FVIII clotting activity of less than 1%) has an inversion of the factor VIII gene. The inversion may be detected by a long PCR (Liu et al Blood 92,1458-59; 1998). This is a simple and reproducible method, that allows to achieve in the genetic diagnosis of inversion causing hemophilia A in about 24 hours. The Long distance PCR (LD-PCR) amplify three very large amplicons typical of inversion intron 22 factor VIII gene (10, 11 and 12Kb) with a very GC-rich region of several kilobases and the quality of the genomic template is very important for the performance of PCR. Recently the Expand Long Template DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) has been changed with a new chemical composition of both, the three buffers and the enzyme mix. The object of the present method is to standardize the technique using the new Expand Long polymerase. For the new protocol the cycling conditions and the concentration of nucleotide primers and the buffer. are changed.The need for a rapid response is determined in the case of hemophilia A patients, not only by the desire to reads a proper classification, but also by the urgency to inform the carrier status of the mother or of a female relative

020

DIAGNOSI MOLECOLARE DI EMOFILIA B: UN CONFRONTO TRA METODI

G. Castaldo1,2, P. Nardiello1,2, F. Bellitti1, A. Rocino3, A. Coppola4, G. Di Minno4, D. Belvini5, R. Salviato5, G. Tagariello5, F. Salvatore1.

1Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Univ. di Napoli "Federico II" and CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli;
2Facoltà di Scienze, Univ. del Molise, Isernia;
3Centro Emofilia e Trombosi, Ospedale S.G.Bosco, Napoli;
4Centro di Coordinamento Regionale Emocoagulopatie, Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Univ. di Napoli "Federico II";
5Blood Bank, Haemophilia Centre, Castelfranco Veneto.

L'Emofilia B (HB) è una patologia emorragica, causata da mutazioni nel gene del Fattore IX, ereditata con modalità recessiva X-linked. Il gene F9 è lungo circa 34 Kb e contiene 8 esoni; lungo tale gene sono state identificate oltre 1000 mutazioni e non esiste un pattern comune di mutazioni causative di malattia in alcuna popolazione studiata. L'identificazione delle portatrici e la diagnosi prenatale sono effettuate mediante linkage o sequenziamento diretto del gene, sensibile ma costoso per l'impiego su vasta scala. Pertanto, molti laboratori hanno sviluppato tecniche di scanning di tutte le regioni codificanti del gene, applicabili su vasta scala. Abbiamo effettuato un confronto tra una nuova procedura in D-HPLC (1), ed una procedura in CSGE, sviluppata presso il laboratorio dell'Ospedale di Castelfranco Veneto, impiegando il sequenziamento diretto come riferimento. Abbiamo analizzato 41 campioni di DNA di pazienti con HB provenienti dal Nord Italia. I risultati delle tre metodiche sono stati confrontati solo al termine dello studio. Il sequenziamento diretto ha identificato 42 mutazioni puntiformi (di cui 11 nuove) ed 1 polimorfismo (nuovo); in due pazienti era stata identificata la presenza di una doppia mutazione, in uno la presenza di una mutazione e di un polimorfismo, mentre in un unico paziente non è stata identificata alcuna alterazione nel gene del FIX. L'analisi degli stessi 41 campioni mediante CSGE ha messo in evidenza 34 delle 43 alterazioni identificate mediante sequenziamento (79%); il D-HPLC ha messo in evidenza 40 delle 43 alterazioni identificate mediante sequenziamento (93%). Nessuno dei due metodi ha fornito risultati falsi positivi. Dopo aver confrontato i risultati tra i due laboratori, i rispettivi metodi sono stati modificati (in particolare nei primers), e la nuova analisi dei 41 campioni ha permesso di identificare tutte le mutazioni rivelate dal sequenziamento. Il nostro studio conferma la sensibilità delle tecniche di scanning; tuttavia, se la diagnosi non corrisponde ai risultati molecolari è necessario ricorrere al sequenziamento diretto. Inoltre, il nostro studio pone l'accento sull'importanza dei controlli incrociati tra diverse metodologie, in particolare se di tipo "home made".

1) Castaldo G, et al. A novel D-HPLC procedure for factor IX gene scanning. Clin Chem 2003;49:815-8.

Supportato da fondi del Ministero della Salute (D.L.vo 229/99, bando 2002), dell'ISS e dell'Università del Molise

021

STUDIO PRELIMINARE DELL'HLA NELLA PATOLOGIA CELIACA NELLA PROVINCIA DI L'AQUILA.

*Papola F., *Azzarone R., *Fioroni A.M., *Rufo A., #Melideo D., *Battistoni C., *Cervelli C., and #Chiaramonte M., *Adorno D.

* Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale - ASL n°4 L'Aquila
# U.O. di Gastroenterologia ASL n°4 L'Aquila

OBIETTIVI: La celiachia è una malattia caratterizzata da una suscettibilità di natura sia ambientale che genetica. Infatti, da una parte è nota l'importanza attribuita all'ingestione di glutine, dall'altra è ormai accertata l'associazione col sistema HLA. In particolare, il 90% dei pazienti celiaci mostra l'aplotipo DQA1*0501/DQB1*0201 (fenotipicamente antigene DQ2) e nel rimanente 10% è prevalente l'aplotipo DQA1*0301/DQB1*0302 (antigene DQ8). In tal senso è stato analizzato un campione di pazienti afferenti all'U.O. di Gastroenterologia tipizzati presso il Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale, al fine di verificare l'associazione HLA-DQ con la malattia celiaca.
METODOLOGIA: Il campione analizzato è costituito da 23 soggetti celiaci diagnosticati in base biopsie duodenali, e da 60 individui di controllo sani. I loci DQA1 e DQB1 sono stati analizzati , dopo estrazione del DNA da sangue periferico in EDTA (salting out), con PCR-SSP (Primers sequenza specifici). La significatività statistica è stata valutata mediante il test del chi-quadro di Yates con il p_{corr} secondo Hawkins.
RISULTATI: Lo studio dei loci DQ mostra una prevalenza significativa degli alleli DQA1*0501, 0201 e DQB1*0201, 0202 nel gruppo dei pazienti celiaci rispetto a quelli di controllo. Il DQA1*0501 è presente nel 32.6% dei malati contro l' 11% dei sani ($p = 0.004$, $RR = 4.21$), il DQA1*0201 nel 35% dei celiaci contro il 18% dei sani ($p = 0.001$, $RR = 8.98$) . Il DQB1*0201 nel 32.6% dei malati e nel 5.8% dei sani ($p = 0.001$, $RR = 5.89$), mentre il DQB1*0202 nel 32.6% dei malati contro il 17.5% dei sani ($p = 0.004$, $RR = 4.116$). Gli eterodimeri formati da DQA1*0501-0505/DQB1*0201-0202 mostrano un $p<10^{-4}$ e un $RR = 33.37$, quindi elevato grado di associazione con la malattia.
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE: I dati preliminari sul nostro campione concordano in generale con i dati della letteratura. In tal senso test genotipici sul sistema HLA possono essere un valido supporto soprattutto in pazienti con diagnosi clinico-strumentale dubbia.

HLA Types in Celiac Disease Patients not carryng the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) Heterodimer:Results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease
Katy Karrel et al
Human Immunology 64, 469-477 (2003).

022

METHODOLOGICAL ASSESSMENT OF mRNA EXPRESSION OF ENDOTHELIN RECEPTORS IN PIG HEART AND CORONARY ARTERIES.

Del Ry S., Vitale R.L., Colotti C., Piersigilli A., Giannessi D.

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy.

In the heart, the endothelin (ET) system is markedly involved in pathophysiologycal mechanisms underlying various cardiac diseases and both ET-receptor subtypes appear to have a role in the regulation of coronary vascular tone. The aim of this study is to evaluate the expression of ET-1 receptors (ET-A, ET-B) in pig coronary arteries (CA), i.e. left anterior descending branch (DA), circumflex artery (CX), and right CA (DX) because little is known on their distribution in the different branches. Methodological problems in the evaluation of mRNA expression of ET-1 receptors in the coronary bed are due to the little size of the tissue available and to the difficult in the isolation of RNA from fibrous samples as well as heart and vessels, due to the aboundance of contractile proteins, connective tissue and collagen. For this, a standardization of the methodological procedure for the evaluation of mRNA expression of ET-1 receptors has been carried out, using RT-PCR, in pig heart (right atrium). GAPDH mRNA expression was determined in each sample as internal control. Total RNA was isolated by guanidinium thiocynate-phenol-chloroform method from tissue samples, stabilized in RNAlater (Qiagen). The presence of proteinase K and the tissue homogenization by Mixer Mill MM300 (Qiagen) allowed us a high yield in the RNA extraction. To check the sensitivity and linearity of the amplification, RT-PCR was performed in a range of different numbers of cycles, annealing temperatures and mRNA concentrations. The RNA purity, estimated spectrophotometrically by the 260/280 nm absorbance ratio, ranged from 1.9-2.1. The optimal reaction conditions chosen were: 0.1-0.2 □g of mRNA; annealing time and temperature of 60 s at 59°C (ET-A and GAPDH primers), 60 s at 56° (ET-B); 30 cycles for ET-A and GAPDH and 35 for ET-B primer; extension time of 10 min at 72°C in all cases. The amplified products were electrophoresed on 1.5% (w/v) agarose gels, stained with ethidium bromide, visualized with an ultraviolet transilluminator. After gel image acquisition, the optical density of the bands was analyzed by Quantity One Software (Bio-Rad). Preliminary results on DA indicated that the presence at mRNA level of both ET-1 receptors can be detected by using samples with a initial weight lesser than 20 mg. The proposed method resulted suitable for evaluate the mRNA expression of ET-1 receptors from tissue samples as those available from CA of humans or animal models.

Reference:Wendel-Wellner M., Noll T, Konig P., et al. Cellular localization of the endothelin receptor subtypes ET-A and ET-B in the rat heart and their differential expression in coronary arteries, veins, and capillaries. Histochem Cell Biol (2002); 118:361-69.

023

MOLECULAR ANALYSIS OF CYP1B1 GENE IN PATIENTS WITH PRIMARY CONGENITAL GLAUCOMA

Lando G. *; Patrosso M. C. *; Penco S.*; Manfredini E.*; Piozzi E.*; Giuffrè I; Gruppo Studio Glaucoma Primario Congenito[~]; Maselli E.[#], Marocchi A.*.

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Patologia Clinica - Settore Analisi Genetiche, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano, [#] Clinica Zucchi, Monza, [~] Gruppo Studio Glaucoma Primario Congenito: S. Calabrò, M. Frontali, A. Guala, V. De Molfetta, V. Abbasciano, M. Frontali, A. Guala, E. Piozzi, Vadalà, A. Magli.

Primary Congenital Glaucoma (PCG) represents 0.01-0.04 % of blindness cases. Its prevalence at birth is 1/10.000. Transmission mode is autosomic recessive with variable penetration, but recent studies have revealed multifactorial and poligenic inheritance. Chromosomic anomalies have been associated with PCG even if they are rarely accompanied by the classic form.

Linkage studies identified a locus (GLC3A) in the 2p21 region, where the gene associated with the more common form was found (CYP1B1). A second locus was located in the 1p36 region (GLC3B), but the gene has not yet been identified. The proband's phenotype appears very early, with high intraocular pressure, with progressive and aggressive clinical development. The goal of this study is to analyze the CYP1B1 gene in patients who have been diagnosed with GCP and in their families, in order to identify the hereditary forms and offer genetic counseling.

The patient enrolment requires the compilation of a clinical form and genetic consensus. Dna analysis was performed by PCR product direct sequencing.

We have collected 29 patients from 21 families coming from different Italian regions.

CYP1B1 molecular analysis has permitted us to identify 8published mutations (5 missense, one insertion, a deletion and a duplication) and 3 new mutations (two substitutions and a stop). Among the carrier patients 9 are double heterozygotes, one is homozygote and another has only a mutation. Analysis of five intragenic single nucleotide polymorphisms established 5' C-G-G-T-A 3' as the most common haplotype among Italian affected individuals.

CYP1B1 mutation frequency in affected patients (40%), confirms the hypothesis that other genes could be involved in this pathology and that the Italian mutation frequency is similar to the other European studies.

024

SOD1 GENE MUTATIONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS : A RETROSPECTIVE ITALIAN STUDY

Battistini S[1], Giannini F[1], Greco G[1], Ferrera L[2], Marini V[2], Causarano R[3], Casula M[8], Lando G[4], Patrosso MC[4], Caponnetto C[5], Origone P[2], Marocchi A[4], Siciliano G [6], Carrera P[7], Orrù S [8], Garrè C [2], Penco S [4]*

[1]Department of Neuroscience, University of Siena, Siena, Italy; [2] Department of Oncology Biology and Genetics, University of Genova, Genova, Italy; [3] Department of Neurological and Vision Science, Niguarda Ca' Granda Hospital, Milano, Italy; [4]Niguarda Ca' Granda Hospital, Clinical Chemistry and Clinical Pathology Laboratory, Milan, Italy; [5]Department of Neurological and Vision Science, University of Genova, Genova, Italy; [6]Department of Neuroscience, University of Pisa, Pisa, Italy; [7]IRCCS H San Raffaele, Clinical Molecular Biology Laboratory, Milan, Italy; [8]Department of Department of Medical Sciences, Medical Genetics, University of Cagliari, Cagliari, Italy.

Objectives To further characterize the frequency and the clinical spectrum of SOD1 gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis.
Methods We studied a total of 263 Italian patients with familial and sporadic ALS. ALS diagnosis was made according to the El Escorial criteria. 38 patients had familial ALS (FALS) while 225 were sporadic cases (SALS). Blood samples were drawn after written informed consent.
Genomic DNA was extracted using standard procedures. Mutation analysis of the five SOD1 exons was carried out by non-radioactive single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis and direct sequence analysis of all the five SOD1 exons by means of the BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem – ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer). Haplotype studies were performed using several polymorphic microsatellite markers flanking the SOD1 locus.
Results We found SOD1 gene mutations in 7 out of 38 FALS patients (18.4%). Six FALS patients carried previously described mutations, the L114F (1 case), the D90A (1 case), the G41S (4 cases) while one patient carried a new G12R mutation. The haplotype study was performed on the L144F and D90A pedigrees. In our L144F pedigree, a shared haplotype with a previously reported Istro-Rumanian FALS patient was found, suggesting that this mutation may derive from a common ancestor. The haplotype study, performed on our D90A recessive pedigree (RFALS), showed alleles conform to the recessive Scandinavian haplotype confirming the data of a single founder for all the recessive D90A families. Moreover, in one SALS patient a previously reported S59S variant in exon 3 was identified. The significant of this variation is unknown.
Also two variations in non coding regions were found: in 17 (3 FALS and 14 SALS) out of 263 patients (6.5%) the already described polymorphism A-C at position 34 of intron 3 (IVS3: +34a→c) was found; in one FALS patient a new variant IVS3+62 T→C were identified.
This variant does not appear to represent a common polymorphism, since it was not detected in 100 normal individuals of the same ethnic origin.
Conclusions In the present study we evaluate the distribution of SOD1 gene mutations in the largest cohort of Italian ALS patients described so far. We found SOD1 gene mutations in 7 out of 38 unrelated FALS (18.4%). No mutations were found in our cohort of SALS patients with the exception of a described SOD1 variant in one case. The percentage of SOD1 mutations in FALS Italian patients in our study was comparable to that reported by most of the surveys on populations from Western countries, ranging from 15 to 20%. These findings support the concept that other genes may be involved in the pathogenesis of ALS.

025

TEST RAPIDI PRENATALI PER LA DIAGNOSI DI ANEUPLOIDIE: QF-PCR

De Leo C., Sedita A., Ferraris M., Lombardo F., Mari C., Leone L., Restagno G.

S.S. Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati A.S.O. O.I.R.M.-S.Anna, Torino

La diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche viene eseguita mediante l'analisi del cariotipo su cellule fetali derivate da villi coriali o da liquido amniotico; i risultati di questo tipo di indagine si hanno in 10-21 giorni con costi elevati. Recentemente, sono state sviluppate tecniche molecolari, come la QF-PCR e la FISH, per la diagnosi prenatale delle più comuni anomalie cromosomiche (trisomie dei cromosomi 21, 13, 18 ed aneuploidie dei cromosomi sessuali) i cui risultati sono ottenibili in 24-48 ore con costi più contenuti. All'inizio del 2003 abbiamo concordato con la Direzione Sanitaria un protocollo di applicazione di test rapidi prenatali, in aggiunta al cariotipo, per indicazioni quali età materna superiore a 42 anni, test di screening positivo ≥ 1/80, sospetto ecografico, età gestazionale > alla 18esima settimana, test integrato positivo, precedente figlio affetto da trisomia. Il test molecolare in uso presso il nostro laboratorio è una PCR semiquantitativa che coamplifica quattro STR sul cromosoma 21, tre sul cromosoma 13, tre sul 18; i risultati si hanno in meno di 24 ore con costi nettamente inferiori al cariotipo. La trisomia è indicata dalla presenza o di tre picchi allelici con area uguale o di due picchi con aree con rapporto > 1.8 o < 0.65. Dal gennaio 2003 ad oggi sono stati eseguiti 1107 test rapidi e sono stati individuati 51 casi patologici (4.62%) e in particolare 32 casi di trisomia 21 (2.9 %), 11 di trisomia 18 (1%) , 6 di trisomia 13 (0.54%) e 2 casi di triploidia (0.18%), tutti confermati con l'analisi del cariotipo, mostrando una affidabilità del 99%. Si è verificato 1 solo caso di falsa positività per trisomia 13 in un prelievo di villi coriali eseguito ad una donna che si era sottoposta al test rapido per ansietà materna e non presentava segni ecografici. L'esame citogenetico aveva riscontato un mosaicismo + 13 con il metodo diretto e un cariotipo normale dopo coltura. La gestante è stata invitata a ripetere il cariotipo da liquido amniotico ed il test molecolare rapido ha dato un risultato normale evidenziando, ancora una volta, la problematica di mosaicismi confinati alla placenta dovuta a questo tipo di materiale. Questo test rapido offre alcuni vantaggi come i tempi di risposta rapidi, l'identificazione dei campioni contaminati da cellule materne (anomalo rapporto tra le aree dei due alleli o picchi extra) e i costi contenuti. Gli svantaggi di questo test sono l'incapacità di evidenziare le aneuploidie a mosaico e la mancata informatività in caso di omozigosi, superabile analizzando un maggior numero di STR .

Donaghue C., Angharad R., Mann K. and Mackie Ogilvie C. 2003. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. Prenat Diagn 23; 201-210

026

VALUTAZIONE DI UN METODO IN REAL TIME PCR PER LA RICERCA E LA DETERMINAZIONE NEL SIERO DI HCV RNA

Marozzi R., Carusillo G.

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

La determinazione del virus dell'epatite C attraverso la ricerca nel siero del materiale genico con tecniche di biologia molecolare, rappresenta un esempio di come possa essere individuato direttamente l'agente eziologico dell'infezione. L'analisi costituisce anche un presidio utile per lo studio dello stato infettivo, prognostico e del monitoraggio della terapia.
E' stato valutato un nuovo metodo in Real time PCR per la determinazione qualitativa e quantitativa dell'RNA di HCV, eseguito con il kit della ditta GeneDia (Lammari – LU), applicato su termociclatore iCycler Bio-Rad. I materiali di calibrazione forniti dalla ditta sono riferiti allo standard WHO 96/790.
Utilizzando campioni di siero conservati a –40°C, sono state eseguite prove di correlazione con il metodo Branched DNA, di concordanza dell'accuratezza diagnostica, di accuratezza, di precisione e di sensibilità.
Il confronto dei risultati dei campioni (n = 9) mediante il test t di student indica una differenza significativa tra i metodi (t = 2,78228, p = 0,0238), differenza peraltro prevedibile per due metodi completamente diversi.
Dalla regressione lineare parametrica (x = test Real Time, y = Branched DNA) si ottengono i valori di intercetta a = 106,73, coefficiente angolare b = 0,289, coefficiente di correlazione r = 0,986; errori standard: a = 573,4 b = 0,019, n = 9.
La precisione è stata calcolata con l'analisi dei dati del ciclo soglia (threshold) dello standard principale (1,6x10^6 UI/mL, lotto 1614 scad. 05/05), con i seguenti risultati: media 27,256, ds 0,292 CV (%) 1,07.
Anche per il parametro della sensibilità analitica le prove sono state eseguite elaborando i risultati di alcuni campioni a basso titolo attraverso gli assunti teorici della metodologia Real Time. Ad esempio impiegando un campione con 1270 UI/mL, ciclo soglia 36,32, posta l'efficienza 100 %, si può individuare in 90 UI/mL la sensibilità teorica del metodo (posto il ciclo soglia a 40) oppure in 138 UI/mL (con ciclo soglia posto a 39,5).
La comparazione dell'accuratezza diagnostica dei risultati eseguiti con i due metodi (n = 17), ha mostrato una concordanza per 15 campioni. Le 2 discordanze sono da attribuire alla maggiore sensibilità del metodo Real Time, che ha quindi evidenziato anche cariche virali molto basse.
La valutazione complessiva del metodo ha permesso un giudizio soddisfacente per qualità analitica (precisione, sensibilità, ecc.) e diagnostica (accuratezza diagnostica), oltre alla buona correlazione con altri metodi.

Neumann A.U. et al. Differences in viral dynamics between Genotypes 1 and 2 of Hepatitis C Virus. J Infect Dis 200;182:28-35.

027

INFEZIONI HCV CORRELATE E MONITORAGGIO DELLA VIREMIA.
HCV-RNA versus HCV CORE ANTIGEN

L. Nisi, L. Tomasicchio, N. Pansini

Unità Operativa Patologia Clinica I Azienda Ospedaliera "Policlinico" Bari

Introduzione.
La diagnosi virologica ed il monitoraggio delle infezioni sostenute dal virus C dell'epatite è fondata sulla ricerca di Ab anti-HCV e su test di biologia molecolare atti alla ricerca, quantificazione e genotipizzazione del virus.
La disponibilità di anticorpi anti antigene core ha permesso, di recente, l'assemblaggio di tests ELISA che permettono di rilevare la presenza dell'Antigene Core nel sangue periferico di pazienti infetti.
Scopo dello studio è stato quello di evidenziare un'eventuale correlazione tra determinazione della viremia con metodiche di biologia molecolare (NAT) e dosaggio dell'antigene core totale con test ELISA.
Materiali e Metodi.
Sono stati effettuati tests su 114 sieri di una popolazione non selezionata (anti HCV positivi e negativi), di età conpresa tra 29 e 63 anni (età media 48,7 anni), di cui 17 donne e 67 uomini.
Su ogni siero è stata effettuata la determinazione di:
1) Anti HCV (Abbott HCV EIA 3.0)
2) NAT Quantitativa (Branched DNA Signal Amplification. Bayer Versant HCV RNA 3.0)
3) HCV Core Ag (Ortho Trak-C^{TM} Assay)
4) NAT Qualitativa (COBAS Amplicor HCV Monitor 2.0 Roche)
Risultati.
Dei 114 pazienti valutati 96 sono risultati anti HCV positivi, 16 Anti HCV negativi, 2 con risultato in gray zone.
La concordanza tra HCV Core Ag e gli altri metodi è stata: 87,7% con Anti HCV; 98,2% con NAT Quantitativa; 95,6% con NAT Qualitativa.
L'indice di correlazione tra HCV RNA (in $\log_{10}$ IU/ml) e Total HCV core Ag (in $\log_{10}$ pg/ml) è stata significativa r^2=0,96.
Discordanza si è avuta solo su due campioni che presentavano bassa viremia.
Conclusione
Il test ELISA Total HCV core Ag, nei nostri studi preliminari, ha dimostrato elevata correlazione con metodiche NAT, sia di tipo qualitativo che quantitativo. Ciò potrebbe portare, in futuro e dopo trials selezionati, ad una valida alternativa alle metodiche NAT per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con patologie HCV correlate. Ciò in relazione alla facilità di esecuzione e conseguentemente alla riduzione del TAT e al contenimento dei costi.

028

VARIANTS IN THE INTERLEUKIN-6 PROMOTER AND CARDIOVASCULAR RISK IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

Pes G.M.[1], Errigo A.[1], Bertolini S.[2], Carru C.[1], Deiana L.[1]

[1]Institute of Clinical Biochemistry, University of Sassari ; [3]Dept. Internal Medicine, University of Genova

Interleukin-6 (IL6) is a multifunctional cytokine which plays a key role as a mediator of inflammatory response and is involved in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD). Within the 5' region of the IL6 gene promoter three single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified (-597G/A, -572G/C and -174G/C) as well as a variable AnTn tract from nucleotide -392 to -373. In this preliminary study we analised 97 patients (M=43, F=54) with molecularly defined familial hypercholesterolemia (FH) subdivided into a CVD positive (n=38) and CVD negative (n=59) group to test for the association of either the IL6 SNPs or the AnTn polymorphisms with the presence of CVD. The entire promoter region of the IL6 gene was amplified from the genomic DNA of the 97 FH patients using a long-range PCR method. The products were sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) with an ABI Prism 310 Genetic Analyzer. No significant differences in genotype distribution at -597, -572 and -174 loci were found. A strong linkage disequilibrium was detected between the loci -597 and -174 (D' $\geq$ 0.90). Only 3 AnTn alleles were observed in all 97 patients: A8T12: 52%, A9T11: 41% and A10T11 (7%). The most common haplotype (-174G/A9T11) was observed in 45.6% and 39.2% of CVD-positive and CVD-negative FH patients, respectively. The other haplotypes had lower frequencies and showed the same frequency in the groups studied. These preliminary findings do not suggest any significant association of IL6 promoter SNPs and AnTn variants with CVD risk in familiar hypercholesterolemia.

029

POLIMORFISMI GENETICI DI ALCUNE CITOCHINE NEL DNA DEI CENTENARI SARDI

Sini M.E.*, Carru C.*, Pes G.M.*, Deiana L.*

*Cattedra di Biochimica Clinica; Università di Sassari; Sassari, Italia.

La longevità è associata con una selezione positiva o negativa di alleli (o aplotipi) che, rispettivamente, conferiscono resistenza o suscettibilità alle malattie (1). Le citochine costituiscono il linguaggio molecolare per la comunicazione tra le diverse cellule del sistema immunitario e tra queste e altri sistemi.
Lo scopo di questo lavoro era quello di studiare i polimorfismi genetici di alcune citochine coinvolte nell'infiammazione, nel DNA di 133 centenari viventi al 31 dicembre 1997. Il gruppo di controllo era formato da 133 sessantenni selezionati random in misura di uno per ogni centenario, appartenenti alla stessa provincia di residenza, con esclusione dei consanguinei.
Il nostro studio ha esaminato cinque polimorfismi: nel fattore di derivazione stromale (SDF-1), la transizione A/G in UTR in 3'; la Δ32 del CCR5; il polimorfismo –308 G/A del TNF-α; la –174 G/C e –597 G/A nel gene dell'interleuchina-6.Il polimorfismo per SDF-1 è stato investigato mediante PCR seguita da RFLP, utilizzando l'enzima MspI. Lo studio della delezione di 32 paia di basi (Δ32) nel gene per CCR5 veniva fatta mediante PCR seguita da elettroforesi in gel di poliacrilamide Lo studio della mutazione –308 G/A del TNF-α è stata fatta mediante ARMS utilizzando uno standard interno. I due polimorfismi dell'interleuchina-6 (-174 G/C e –597 G/A) mediante PCR seguita da RFLP. Per la –174 G/C si utilizzava l'enzima Hsp92II mentre per la –597 G/A si utilizzava il Fok I.
Risultati: per il CCR5 Δ32: allele normale 0.984 allele mutato 0.01 sia nei centenari che nei controlli.
Per l'SDF-1, le frequenze genotipiche erano: AA 62.74%, AG 31.37%, GG5.88% nei centenari e AA 58.54%, AG 35.36%, GG 6.1% nei controlli. Per il TNF-□, GG 90.52%, GA 9.48%, AA 0% nei centenari, GG 81.63%, GA 16.33%, AA 20.4% nei controlli. Interleuchina-6: (-174 G/C e –597 G/A): GG 53.70%, GC 38.89%, CC 7.41% nei centenari, GG 49.6%, GC 44%, CC 6.4%, nei controlli. La –174 G/C e la –597 G/A sono in linkage disequilibrium.
Conclusioni: i risultati ottenuti non hanno mostrato differenze significative tra la popolazione dei centenari e quella dei controlli. Allo stato attuale sono in corso ulteriori studi su altre citochine e su un numero più ampio di campioni.

Bibliografia.

[1]Deiana L., Ferrucci L., Pes G.M., Carru C., Delitala G., Ganau A., Mariotti S., Nieddu A., Pettinato S., Putzu P., Franceschi C., Baggio G.: AkentAnnos. The Sardinia studi of estreme longevità. Aging Clin. Exp. Res.. 11: 142-149, 1999.

030

FOUR NEW MUTATIONS IN MILD HEMOPHILIA A PATIENTS.

*Cabrio *Lombardi A.M., °Navaglia F °Plebani M., *Girolami A.

*Department of Surgical and Medical Sciences 2° chair of Medicine,University of Padova Italy.
°Department of Laboratory Medicine University of Padova Italy.

Hemophilia A is one of the most common bleeding disorders in man, and it is caused by a large number of mutations in the factor VIII gene (FVIII). FVIII gene is a large gene located in Xq 28. It contains 26 exons and is 186 kb in length that code for a signal peptide and a 2332 aminoacid chain. Several hundred mutations within the FVIII gene have been described and these causative mutations are distributed in all coding as well as in untranslated regions. Both the clinical heterogeneity of Hemophilia A and the high proportion of de novo mutations suggested that a large number of different mutational lesions would eventually be found in the factor VIII gene of hemophiliacs. The majority of mutations found in mildly affected patients are single base pair substitutions that resulted in loss of function but not complete absence of the FVIII protein. Overall benefits for patient care may result also from the knowledge of the FVIII mutations present in patients with mild hemophilia. In this study we report four different new missense mutations in mild hemophilia A patients (IVS14 +3 A>G; exon 18 Val 1962Met ; promoter 5'-43 C>T; exon 19 Tyr 2012 Ile) detected by dHPLC and direct sequencing. It is interesting to know that mutations in quite different areas of the FVIII gene (promoter, exons 18 and 19 and splice junctions) may yield the same phenotype . Mild hemophilia is in fact characterized by factor VIII clotting activity of 5-20% of normal and normal or mean antigen. A proper molecular biology classification of all cases of hemophilia A is also important for carrier detection and genetic conselling.

031

VALIDAZIONE DELL' ANALISI DEI POLIMORFISMI DI ApoE CON LA TECNICA PYROSEQUENCING

Lombardo F., Gomez A.M., Mari C., Cocco E., De Leo C., Sedita A., Ferraris M., Leone L., Restagno G.

S. S. Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati A.S.O. O.I.R.M-S.Anna, Torino

Scopo di questa ricerca è valutare l'affidabilità della tecnica Pyrosequencing per l'analisi dei polimorfismi della Apolipoproteina E (ApoE) avvenuta fino ad ora mediante studio dei frammenti prodotti da clivaggio enzimatico con risoluzione su gel di poliacrilammide. Con la nuova tecnica si effettua una sequenza in real time senza utilizzo di marcatori consentendo una rapida e accurata analisi di brevi sequenze di DNA. Si analizzano due SNPs (single nucleotide polymorphisms) che sono causa di una sostituzione aminoacidica nelle posizioni 112 (SNP 112) e 158 (SNP 158) della proteina che coesiste in tre forme alleliche comuni: ε 2 (SNP 112: Cys/ SNP 158: Cys); ε 3 (SNP 112: Cys/ SNP 158: Arg); ε 4 (SNP 112: Arg/ SNP 158: Arg). Si effettua una singola PCR per amplificare un frammento che comprenda le due posizioni polimorfiche. Il templato così amplificato viene denaturato a ss DNA (single strand), ibridizzato con un sequencing primer e incubato con DNA polimerasi. Ogniqualvolta viene incorporato un nucleotide nella sequenza in costruzione, viene rilasciato pirofosfato (PPi) in quantità equimolare. Il PPi viene convertito da una sulfurilasi in ATP diventando il substrato per la luciferasi che genera così un'emissione luminosa captata da una CCD camera e convertita in un picco nel pirogramma. Il processo riprende dal principio con aggiunta di un nuovo nucleotide. In questo modo viene costruito uno strand complementare allo stampo fornito in partenza e la sequenza viene determinata in funzione dei picchi che si susseguono nel pirogramma ottenuto con lo strumento e il software PSQ96MA. Sono stati analizzati fino ad ora 202 campioni, già testati con la metodica del clivaggio enzimatico, provenienti da una casistica comprendente due gruppi di pazienti con AD (Alzheimer Disease) probabile secondo i criteri NINCDS/ADRDA. Un gruppo di 34 pazienti presentava EOAD (early onset AD), l'altro gruppo di 82 pazienti LOAD (late onset AD), il gruppo di controllo di 86 anziani non presentava disturbi cognitivi. In questa casistica l'allele ε 4 è risultato essere fortemente associato(p=0.002) con la forma LOAD. L'analisi dei polimorfismi ApoE con la metodica Pyrosequencing in tutti i 202 i casi ha confermato gli stessi risultati ottenuti con la metodica "classica" precedentemente applicata. La tecnica Pyrosequencing risulta riproducibile, piu' rapida, e meno costosa della tradizionale.

McNeely T. 2003. Pyrosequencing AB. Pharmacogenomics Mar; 4 (2): 217-21

032

IPERMETILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE GSTP-1: UNA OPPORTUNITA'DI PREVENZIONE DEL (PCA).

Mazzeo A., Varriale G., Paduano M.., *Cianciulli MR:, e* Rega C.

Dia-Chen srl "Biotecnologie Mediche" Napoli,
*Dip. Pat. Di Lab. A.O. "S: G. Moscati" Avellino

Il gene GSTP1, codificante l'enzima Glutatione-S-transferasi, può avere una funzione di "sentinella" per le cellule prostatiche. Nella maggior parte dei casi di PCA (carcinoma prostatico), le cellule presentano una ridotta espressione di tale enzima causata molto frequentemente dalla ipermetilazione delle regioni "CpG islands" del promotore del gene.

La perdita di funzione del GSTP1 è caratteristica delle lesioni nell'epitelio prostatico neoplastico (PIN), e può rappresentare un precoce marcatore della PCA. Recentemente è stato dimostrato che nell'atrofia infiammatoria proliferativa (PIA), caratterizzata dalla presenza di cellule prostatiche proliferative e di cellule infiammatorie , è presente un'elevata espressione di GSTP1. Alla luce di tali dati si è sviluppato un nuovo modello di carcinogenesi prostatica, in cui le cellule prostatiche nelle lesioni PIA esprimono alti livelli dell'enzima GSTP1 come difesa contro il danno ossidativo del genoma. Allorquando cellule con un deficit di GSTP1 compaiono tra le le cellule PIA, esse diventano vulnerabili agli agenti ossidanti che provocano un danno al genoma promuovendo la trasformazione neoplastica a PIN ed a cellule PCA. Questo nuovo modello di carcinogenesi prostatica ha implicazioni per lo sviluppo di nuove strategie di prevenzione del tumore. Lo scopo dei nostri studi è quello di sviluppare un metodo riproducibile, sensibile e affidabile che consenta, mediante la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR), di evidenziare lo stato di ipermetilazione del promotore del gene GSTP1 in campioni (urine, siero, tessuto) di pazienti con diverse patologie prostatiche. Sono stati scelti primers specifici per sequenze di DNA genomico metilate e non metilate nella regione "GpC island" del DNA somatico. E' stato messo a punto un kit per l'estrazione del DNA da urine, per la conversione del DNA con sodio bisulfito, e per l'amplificazione. Ogni campione viene amplificato con 2 mix PCR con primers metilati e non metilati., la rilevazione avviene su gel-agarosio 4%.Dati preliminari; sono stati analizzati n. 30 campioni di soggetti presumibilmente sani, e 28 campioni con patologia prostatica. Tutti i campioni di controllo hanno prodotto solo un frammento di 97bp,non metilato, mentre 17 dei 28 campioni patologici (60,7%) hanno prodotto un frammento di amplificato non metilato di 97 bp e metilato di 91 bp. Alla luce di questi primi dati, riteniamo che il sistema sia affidabile, si prosegue la sperimentazione per la riproducibilità del metodo e l'accuratezza dei risultati.

033

VALUTAZIONE DI UN METODO IN REAL TIME PCR PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA NEL SIERO DI HBV DNA

Marozzi R.; Carusillo G.

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

Il virus dell'epatite B (HBV) è l'agente eziologico di numerose patologie epatiche severe. Uno dei marcatori che appare efficace per monitorare l'infezione e la terapia è rappresentato dal dosaggio quantitativo del HBV-DNA nel siero.
Scopo del lavoro è stato quello di una valutazione preliminare del metodo in Real time PCR per la determinazione quantitativa del HBV-DNA, eseguito con il kit della ditta GeneDia (Lammari – LU), applicato su termociclatore iCycler Bio-Rad. L'amplificazione è eseguita con l'uso di due primer diretti alla regione pre-core del virus, con la produzione di un frammento di circa 104 bp. Il materiale di calibrazione fornito dalla ditta è riferito allo standard WHO 97/746.
Sono stati impiegati campioni di siero conservati a –40°C, eseguendo prove di correlazione con il metodo MEIA con ibridazione, di concordanza dell'accuratezza diagnostica, di specificità, di precisione e di sensibilità.
La regressione lineare parametrica (x = Real Time, y = MEIA ibridazione) indica valori di intercetta a = 6715,99, coefficiente angolare b = 22,85, coefficiente di correlazione r = 0,974; errori standard: a = 25960, b = 3,08, n = 10.
La precisione è stata calcolata con l'analisi dei dati del ciclo soglia (threshold) dello standard principale (2,8x10^6 UI/mL, lotto 1237 scad. 11/03), con i seguenti risultati: media 23,472, ds 1,955 CV (%) 8,33.
Le prove per determinare la sensibilità analitica, data la necessità di contenere i costi, sono state eseguite elaborando i risultati di alcuni campioni a basso titolo mediante gli assunti teorici della metodologia Real Time. Con un campione di 9970 UI/mL e ciclo soglia 32,06, posta l'efficienza 100 %, la sensibilità del metodo è stata calcolata a 39 UI/mL, posto il ciclo soglia a 40 oppure a 79 UI/mL con ciclo soglia posto a 39.
La comparazione dell'accuratezza diagnostica dei risultati eseguiti con i due metodi (n = 12), ha mostrato una concordanza per 10 campioni. Le discordanze, relative a pazienti in follow up, sembrerebbero attribuibili alla maggiore sensibilità del metodo Real Time, che avrebbe determinato cariche virali molto basse. La specificità analitica è stata controllata, con esito positivo, impiegando le curve di dissociazione.
E' possibile esprimere un giudizio soddisfacente per qualità analitica (precisione, sensibilità, specificità), diagnostica (accuratezza diagnostica) e la disponibilità di una correlazione con altro metodo.
- Ide T. et al. A real-time quantitative polymerase chain reaction method for hepatits B virus in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. Am J Gastroenterol 2003;98(9):2048-2051.

034

ANALISI DEL GENE DELL'ALFA-1-ANTITRIPSINA IN PAZIENTI CON BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA

Pirina P.[1], Pes G.M.[2], Errigo A.[2], Perino M.G.[2], Paschino P. [1], Deiana L. [2], Carru C. [2], Ginesu F. [1]

[1]Istituto di Malattie Apparato Respiratorio, Università di Sassari; [2]Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari

L'alfa-1 antitripsina (Proteinase Inhibitor, Pi) è un inibitore delle proteasi ed in particolare dell'elastasi dei leucociti neutrofili. É una proteina altamente polimorfica di cui si conoscono oltre 75 varianti, alcune delle quali associate a ridotta attività funzionale. Vari studi epidemiologici hanno evidenziato un'associazione tra tali varianti e rischio di Bronco-Pneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO). In questo studio caso-controllo sono stati indagati 78 pazienti (M=47, F=31, età media 67.6 ± 10.1) con BPCO in fase di stabilizzazione clinica, suddivisi per stadio di gravità della malattia sulla base dei valori di FEV1 e secondo i criteri suggeriti dall'American Thoracic Society. Il gruppo di controllo era costituito da 224 soggetti di 60±5 anni senza alterazioni significative della funzionalità polmonare. Sono state tipizzate le varianti più comuni del gene Pi nelle popolazioni occidentali: la variante M (100% di attività), S (Glu264Val, 80% di attività), Z (Glu342Lys, 60% di attività) ed i polimorfismi M2 (Arg101His) e M1 (Val213Ala). Le varianti M, S e Z sono state determinate mediante PCR multipla (Rieger et al., 1999) e i polimorfismi M2(Arg/His) e M1(Val/Ala) mediante analisi di restrizione con RsaI e BstEII. La frequenza degli eterozigoti Pi MS nei pazienti con BPCO non era significativamente aumentata rispetto ai controlli di 60 anni (6.4 % vs 9.4%, P=0.739). La variante Pi Z in eterozigosi è stata riscontrata esclusivamente in un paziente con BPCO e in nessuno dei controlli. Non di discostava dai controlli neppure la frequenza delle varianti Pi M1 (P=0.377) e Pi M2 (P=0.647). La media del FEV1 nel gruppo dei pazienti BPCO con la variante Pi S non era significativamente differente da quella dei pazienti portatori delle altre varianti (69.9 ± 18.0 vs 62.9 ± 22.0, P>0.05). Questi risultati, anche se ottenuti in un campione numericamente limitato, non mettono in evidenza differenze significative nella distribuzione delle varianti Pi tra pazienti con BPCO e individui con normale funzionalità polmonare. In particolare non è stato osservato tra i malati un aumento della frequenza dei portatori della variante S, in accordo con quanto riportato in letteratura.

035

EFFETTI DEI POLIMORFISMI DEL GPIB E DEL VWF SUL RISCHIO DI INFARTO MIOCARDICO IN UN CAMPIONE DI GIOVANI SARDI

[§]Musino L.; [§]Rossi R.; °Partenza A.; °Barca M.; Bitti *PP; [§]Carru C.; [§]Deiana L.

[§]Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari; °Laboratorio di Analisi"Zonchello", *Laboratorio di Tipizzazione Tissutale ASL n°3 Nuoro

Il ruolo dei fattori ambientali nello sviluppo dell'infarto miocardico acuto (IMA) è stato ampiamente dimostrato, mentre il ruolo dei fattori genetici, e in particolare quelli legati alla trombogenesi, è ancora da definire. Il complesso GpIb-IX-V media l'iniziale e transitoria aggregazione piastrinica alla matrice extracellulare attraverso il legame del fattore di von Willebrand (vWF) con la glicoproteina Ib-α (GpIb-α). Nel nostro studio abbiamo valutato il contributo dei polimorfismi HPA-2a/b (GpIb-α) e –1051A/G (vWF) sul rischio di IMA giovanile. Il polimorfismo funzionale HPA-2a/b è caratterizzato dal dimorfismo amminoacidico Thr/Met al residuo 145 della proteina GpIb α nel dominio di legame per il vWF. Il polimorfismo –1051A/G, localizzato nella regione del promotore, è stato correlato con i livelli plasmatici della proteina il cui incremento aumenta il rischio di patologie cardiovascolari.
Pazienti e metodi Il gruppo studiato comprende 71 giovani infartuati della provincia di Nuoro (M= 61, F= 10; età media 45,2±4,2) e 150 soggetti di controllo reclutati in maniera random nella popolazione sarda.
L'identificazione genotipica dei polimorfismi oggetto di questo studio è stata effettuata mediante PCR seguita da digestione enzimatica (1). Per comparare le distribuzioni genotipiche abbiamo utilizzato il test χ^2.
Risultati. L'analisi del polimorfismo HPA-2a/b ha evidenziato una prevalenza del genotipo omozigote mutato BB nel 2,82% nei casi rispetto allo 0,7% dei controlli, con una differenza statisticamente significativa (P= 0.0025). Lo studio dell'aplotipo –1051G ha evidenziato frequenze genotipiche simili sia per gli omozigoti wild-type AA che per gli eterozigoti AG. Sebbene il genotipo mutato GG sia maggiormente rappresentato nei casi la differenza non è statisticamente significativa.
Conclusioni Nel nostro studio la maggiore incidenza di individui omozigoti BB nei pazienti rispetto al gruppo di controllo suggerisce che il polimorfismo HPA-2a/b della glicoproteina GpIb-α sembra essere associato con l'infarto del miocardio.
Per quanto riguarda il secondo polimorfismo in esame i dati da noi ottenuti non evidenziano una correlazione tra l'aplotipo –1051G del promotore del vWF e incremento del rischio cardiovascolare. Ulteriori studi sono necessari comunque per definire il ruolo di tali fattori genetici in una patologia multifattoriale quale l'infarto miocardico.

(1) Rosenberg N., IMAJ, 4: 411—414; 2002.

036

SYNERGISTIC EFFECT OF H. PYLORI INFECTION AND INTERLEUKIN 12 POLYMORPHISMS FOR THE DEVELOPMENT OF GASTRIC CANCER

Navaglia F., Zambon C.-F.*, Basso D., Fogar P.*, Greco E., Falda A., Gallo N., Belluco C.[§], Farinati F.^, Cardin R.^, Nitti D[§],Rugge M°, Di Mario F[#], Plebani M.

Dept. of Laboratory Medicine, *Medical and Surgical Sciences, [§]Oncological and Surgical Sciences ^Gastroenterology, °Pathology, Padua University, [#]Gastroenterology, Parma University, Italy.

One of the features of H. pylori (Hp)-associated gastric mucosal inflammation is the prevalence of T helper 1 over T helper 2 infiltrating lymphocytes. IL12, a cytokine made of two subunits, p35 and p40 encoded by IL12A and IL12B genes respectively, favours Th1 differentiation and is enhanced in Hp infected gastric mucosa. Aims were to: 1. screen by DHPLC promoters and coding sequences of IL12A and IL12B to identify any SNPs; 2. to analyze the number of CT and of TG-TA dinucleotide repeats (VNTR) of IL12A intron 6 and of IL12B intron 4 (capillary electrophoresis) in a series of 361 patients with (n= 197) and without (n= 164) Hp infection; 3. to verify the association, if any, of the studied IL12 genes polymorphisms with Hp infection outcome, gastric adenocarcinoma in particular. We identified two SNPs on IL12A (-504 T/G and +6686 A/G) and one on IL12B (+15485 A/G). Eleven and six alleles were found for IL12A and IL12B VNTR respectively. IL12A and IL12B SNPs were in Hardy Weinberg equilibrium; IL12A SNPs were correlated with IL12A VNTR genotypes, while IL12B genotype was correlated with IL12B VNTR genotype. Body activity was correlated with IL12B VNTR: mild-moderate body activity was more frequently recorded in patients with $(TG\text{-}TA)_{11}/(TG\text{-}TA)_{11}$ genotype ($X2=47.75$, $p<0.001$). In Hp positive patients, IL12A -504 SNP was correlated with cagA (Fisher's exact test: $p<0.05$; Odds ratio=2.34, CI:0.91-5.98) and with antral activity ($X2=8.83$, $p<0.05$). The frequency of gastric adenocarcinoma (110 patients) was higher in patients with IL12A -504T/T genotype (Fisher's exact test: $p<0.05$), in those with IL12B VNTR $(TG\text{-}TA)_9/(TG\text{-}TA)_{11}$ genotype ($X2=12.40$, $p<0.05$) and in those infected by cagA positive strains (Fisher's exact test: $p<0.05$). Logistic regression analysis (dependent variable= gastric adenocarcinoma; predictors= IL12A -504, IL12B VNTR, and cagA) confirmed the combined roles of cagA and of IL12 polymorphisms as risk factors for gastric adenocarcinoma (IL12A –504: OR=2.38, CI=0.96-5.88; IL12B VNTR: OR=1.36, CI=1.05-1.76; cagA: OR=1.68, CI=0.84-3.35). In conclusion: 1. two IL12A SNPs and one IL12B SNP were identified; 2. the IL12A and IL12B VNTR varied in a wide range and the resulting genotypes were correlated with the corresponding genes' SNPs; 3. IL12A –504 SNP and intronic VNTRs might influence gastritis activity and the risk of gastric adenocarcinoma possibly by interferring with transcription processes or by affecting secondary DNA structure.

037

AMYLOID BETA PRECURSOR PROTEIN (AβPP) MUTATIONS AND APOLIPOPROTEIN E ALLELES IN ITALIAN PATIENTS AFFECTED BY HEREDITARY CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY.

Donadei S.*; Obici L.*, Marciano S.*; Moratti R.[#] ^, Melzi d'Eril G.V.[•]; Merlini G.*^

Lab. di Biotecnologie*, Serv. Anal. Chim-Clin.[#], IRCCS Pol. San Matteo, Pavia e Dip. Biochimica^, Univ. di Pavia,; Dip. SBSC Univ. dell'Insubria, Varese[•]

The cerebrovascular deposition of amyloid fibrils, particularly in the walls of leptomeningeal and cortical arteries and arterioles, is a well-recognized cause of primary intracerebral hemorrhagic stroke, ischemic lesions and dementia. The Aβ peptide is the amyloid subunit in most forms of cerebral amyloid angiopathy (CAA), including sporadic CAA, CAA related to Alzheimer's disease (AD) and rare hereditary conditions caused by mutations located at codons 692-694 of the AβPP gene. We searched for mutations in the AβPP gene in 4 Italian kindreds with recurrency of intracerebral hemorrhagic stroke and cognitive decline.
Methods. Mutation analysis was performed by automated sequencing of exon 17 of AβPP. Apolipoprotein E alleles were determined by restriction fragment length polymorfism (RFLP).
Results. An AβPP mutation was associated with the disease in all families studied. In one kindred, a novel valine for leucine substitution at position 705 was identified. All affected members were heterozygous for this mutation, as confirmed by RFLP analysis. Moreover, this mutation was not found in 100 controls. Neuropathologic analysis of autoptic material from one patient showed intense amyloid deposition in the walls of small and medium-sized arteries of the frontal, temporal and parietal lobes. Immunoelectron microscopy showed cospicuous amounts of perivascular amyloid fibrils, strongly immunoreactive against both anti -$A\beta_{1-40}$ and anti-$A\beta_{1-42}$ antibodies.
In one family, the disease was associated with the Ala713Thr mutation, which has already been observed in another family with AD (1). Characterization of the apoE alleles of the proband disclosed the ε4/ε4 genotype, which is known to contribute to CAA-associated hemorrahages. In the other 2 kindreds the disease was caused by Glu693Lys variant.
Conclusions. The new AβPP Leu705Val variant expands the spectrum of Aβ mutants associated with CAA, strengthening previous observation that mutations within the coding region of Aβ are predominantly associated with hemorragic stroke instead of typical AD clinical picture. The possible contribution of apoE genotype to the clinical features of hereditary CAA remains to be explored.

1. Miravalle L, Tokuda T, Chiarle R et al. JBC, 2000; 275:27110-27116.

038

APPLICAZIONE DELLA TECNOLOGIA MICROARRAY PER LO STUDIO DEI PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA NEL K-GASTRICO

Marseglia M.G.[♦], Nannetti G.[♦], Bernabini S.[♦], Frusconi S.[♦], Magi A.[♦], Pelo E.[♦], Rinnovati A.°, Torricelli F.[♦]

[♦]U.O. Citogenetica e Genetica Aoc, °U.O. Chirurgia Generale Asl8 zona Casentino

Il carcinoma gastrico rappresenta il 10% di tutti i tumori nel mondo ed è la prima causa di morte per neoplasia in Giappone, Cina e Corea. In Italia, pur avendo assistito ad una riduzione dei nuovi casi/anno, esistono comunque zone in cui il carcinoma gastrico costituisce la prima causa di morte per tumore. La zona del Casentino, tra le province di Firenze e Arezzo, presenta un'incidenza paragonabile a quella Giapponese: circa 100 casi su 100.000.
L'analisi microarray si candida come tecnologia innovativa in grado di valutare l'espressione di 14.000 geni in un singolo esperimento. Alla nostra U.O. sono pervenute, dalla U.O. Chirurgia Generale ASL 8 zona Casentino, biopsie di mucosa gastrica tumorale e sana relative a 10 pazienti appartenenti all'area casentinese e affetti da cancro gastrico. Per ciascun paziente, l'RNA è stato estratto da una biopsia di mucosa gastrica tumorale e da un frammento di mucosa sana adiacente all'area tumorale. La tecnologia Stanford prevede la coibridazione sullo stesso array dell'RNA estratto da tessuto sano, marcato ad esempio con Cy3 (verde), e dell'RNA estratto da tessuto tumorale, marcato ad esempio con Cy5 (rosso). La quantificazione dei livelli di espressione genica si basa sulla valutazione dei rapporti delle fluorescenze emessa dai due fluorofori ($\log_2$ Cy5/Cy3). Sebbene lo studio di espressione non sia stato completato per tutti i soggetti appartenenti alla casistica, l'analisi dei dati ottenuti fino ad ora ed il confronto con quelli già presenti in letteratura, ha fornito numerose informazioni in merito all'espressione differenziale, tra test e controllo, di geni implicati in diversi meccanismi cellulari: geni ad azione antiapoptotica, oncogeni, geni coinvolti nello sviluppo, crescita, motilità cellulare e processi metastatici. Una volta completato lo studio di espressione, parte dei dati verranno validati mediante Real Time PCR. L'obiettivo finale sarà l'analisi di clustering nella quale geni con pattern di espressione simili verranno raggruppati (cluster); tale raggruppamento permetterà di riconoscere geni implicati negli stessi pathway. In questo modo sarà possibile, partendo da un unico gruppo di soggetti caratterizzati dallo stesso fenotipo clinico, individuare sottogruppi di pazienti con fenotipi molecolari distinti.

039

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA FENILCHETONURIA E NUOVA PROCEDURA IN DHPLC PER LO STUDIO DI MACRODELEZIONI

[1,2]A. Daniele, [1]G. Cardillo, [1]C. Pennino, [3]D. Scognamiglio, [3]MT. Carbone, [3]A. Pignero, [1,2]G. Castaldo, [1]F. Salvatore

[1]Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" and CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli; [2]Università del Molise, Isernia; [3]Centro di Screening, Ospedale SS. Annunziata, ASL 1, Napoli, Italy.

La fenilchetonuria (PKU, MIM 261600), uno dei più comuni difetti genetici del metabolismo, è dovuto al deficit di fenilalanina idrossilasi (PAH: E.C.1.14.16.1), un enzima epatico responsabile del metabolismo della fenilalanina. Il deficit di questo enzima, trasmesso come carattere autosomico recessivo, è dovuto a mutazioni nel gene PAH. I pazienti affetti da PKU sviluppano, oltre a sintomi di minore entità, un variabile deterioramento neurologico se non sono sottoposti a dieta dai primi giorni di vita. La malattia è caratterizzata da un ampio spettro di fenotipi biochimici e clinici. Studi molecolari hanno dimostrato una grande variabilità genetica alla base di quella fenotipica; a tutt'oggi, infatti, sono state identificate più di 400 mutazioni nei 13 esoni e nelle 24 giunzioni esone/introne del gene PAH che presentano grosse differenze nella frequenza e nella distribuzione geografica. In questo lavoro abbiamo studiato le basi molecolari della PKU in Campania, utilizzando il DHPLC e il sequenziamento diretto. Sono stati analizzati 160 alleli di pazienti non correlati; mutazioni sono state ritrovate nel 92% dei cromosomi analizzati. Da questo studio le mutazioni più frequenti risultano essere cinque (IVS10nt-11G>A, L48S, R261Q, R261X e P281L), rappresentando il 42% degli alleli PKU campani; le altre alterazioni risultano essere rare. Sono state inoltre identificate alcune mutazioni nuove e ritrovate due mutazioni in cis, in famiglie separate. Per poter identificare delezioni di interi esoni, abbiamo messo a punto una procedura innovativa che prevede l'utilizzo del DHPLC; si tratta di un metodo altamente efficiente ma semplice e rapido da poter adattare anche nello screening genetico e nella diagnosi della PKU. Con questo metodo abbiamo identificato 2 delezioni di un intero esone in 2 differenti pazienti. Questo dato suggerisce che macrodelezioni in eterozigosi (difficili da identificare con le correnti tecniche di diagnostica molecolare) potrebbero esser presenti in alleli di pazienti risultati negativi alle indagini molecomolecolari di screening anche in altre malattie genetiche ereditarie.

Il lavoro è stato supportato da fondi del Ministero della Salute (L502/92, annualità 2003) e dell'Università del Molise.

040

STUDIO IN VITRO E IN VIVO SULL'EFFICACIA DELLA TERAPIA GENICA COMBINATA DELL'EPATOCARCINOMA (HCC)

A.L.Stefani, L.Barzon*, I. Castagliuolo*, M. Guido°, G.Palù *, F.Farinati

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche, *Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, ° Ist. di Anatomia Patologica, Università di Padova

La prospettiva del possibile utilizzo di terapie alternative, quali la terapia genica, in pazienti con neoplasie (come l'HCC) in fase avanzata non passibili di altri trattamenti chirurgici o meno, sono di grandissimo interesse clinico-sociale.
Scopo dello studio è stato quello di valutare l'efficacia della terapia genica combinata immunomodulante e suicida per l'HCC, utilizzando un vettore retrovirale codificante per interleuchina 2 e per timidina chinasi di HSV (HSV-TK). Il sovranatante virale di cellule di packaging Am12 è stato utilizzato per trasdurre linee cellulari umane e murine di epatocarcinoma. Mediante real-time RT-PCR è stata dimostrata l'espressione dei transgeni nelle cellule tumorali trasdotte. Gli esperimenti in vitro hanno dimostrato una citotossicità del GCV tempo e dose dipendente. I valori di IC_{50} dopo 5 giorni di trattamento variavano, nelle cellule trasdotte, tra 0.2 e 20mcM. Lo studio dell'effetto bystander in vitro mostrava un'inibizione della crescita nelle popolazioni cellulari miste contenenti solo il 25% di cellule TK-positive simile a quella ottenuta con il 100% di cellule TK-positive. Lo studio in vivo è stato eseguito in un modello animale di HCC ottenuto mediante inoculazione s.c. di 10^7 cellule BNL1MEA7R.1 trasdotte e non trasdotte in topi singenici balb/c. Dopo 10 giorni i topi venivano trattati con somministrazione i.p. di PBS o GCV alla dose di 100mg/kg per 6 giorni. E' stato inoltre valutato l'effetto sistemico dell'IL-2 in vivo inoculando lo stesso animale con cellule trasdotte nel fianco destro e cellule non trasdotte nel fianco sinistro, ed eseguendo poi il trattamento con GCV. Gli animali venivano sacrificati 24h dopo l'ultimo trattamento e sono stati valutati i seguenti parametri: volume della massa tumorale, infiltrato infiammatorio, necrosi, apoptosi e sclerosi. Il trattamento con GCV portava ad una regressione pressoché completa del tumore di cellule trasdotte (1% della massa originale). L'analisi istologica mostrava un significativo aumento di infiltrato infiammatorio e di apoptosi e ampie aree di necrosi e di sclerosi. E' stata inoltre dimostrata la presenza in vivo di un effetto sistemico poiché il trattamento con GCV portava non solo ad una regressione pressoché completa del tumore TK-positivo presente nel fianco di destra, ma anche ad una completa inibizione della crescita del tumore TK-negativo nel fianco controlaterale.
In conclusione, abbiamo dimostrato l'efficacia in vitro e in vivo della terapia genica combinata dell'HCC mediante utilizzo di vettori retrovirali, con la presenza di un significativo effetto bystander in vitro e di un efficace effetto sistemico terapeutico in vivo.

041

IMPORTANZA DIAGNOSTICA DELLA RICERCA DEL PAPILLOMA VIRUS (HPV) NEL CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

Venturi C., Giuntoli C., Pieraccini L., Bianchi L.

Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Pescia (PT).

Il carcinoma squamoso della cervice e le lesioni che lo precedono sono inequivocabilmente correlate all'infezione da HPV. Il carcinoma della cervice uterina è stato associato infatti in più del 95% dei casi alla presenza di HPV ad alto rischio oncogeno.
Obiettivi. Scopo del nostro studio è stato valutare la correlazione esistente fra ceppi ad alto rischio oncogeno (HPV 16,18,31,33) e gravità delle lesioni intraepiteliali rilevate al pap-test e all'esame istologico della biopsia della cervice.
Metodologia. Sono state analizzate 583 donne di età compresa tra i 15 e gli 81 anni (febbraio 2001-ottobre 2003) con lesioni intraepiteliali di basso o alto grado (LSIL o HSIL) o anomalie squamose di incerto significato (ASCUS) al pap-test. Su prelievo endocervicale è stata effettuata ricerca e genotipizzazione dell'HPV utilizzando la PCR (reazione a catena della polimerasi) con primers specifici della regione L1 e digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione Tru91 e Rsa1 (Diatech).
Risultati. L'infezione da HPV è stata riscontrata nel 22% (35/160) di ASCUS, nell'82% di LSIL (116/141) e nel 94% di HSIL (16/17).Gli HPV ad alto rischio rappresentavano il 68,6% (24/35) di ASCUS HPV-positivi, il 65,5% (76/116) di LSIL HPV-positivi ed il 94% (15/16) di HSIL HPV-positivi. Al controllo istologico dei 17 HSIL, 1 presentava un carcinoma in situ, 7 una displasia grave, 5 una displasia moderata, 3 una displasia lieve e 1 una leucoparacheratosi.
Conclusioni. Dai nostri dati emerge l'incidenza più alta di ceppi ad alto rischio oncogeno nelle lesioni di alto grado. Questi risultati indicano la necessità di monitorare le pazienti che presentano ceppi di HPV ad alto rischio in presenza anche di lesioni intraepiteliali di basso grado in quanto soggette a sviluppare lesioni pre-cancerose più gravi.
Bibliografia. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol 2002 Jan 3:11-6.

042

RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI MMP1 ED MMP3 NELLA CAPACITA' DI CRESCITA DEI GOZZI TIROIDEI

Turri O.*, Martucci M.* De Pasquale L.**, Andreani S.**, Bastagli A.** Biondi M.L.*, Guagnellini E.*

*Laboratorio Chimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Paolo-Milano
**Unità Dipartimentale di Chirurgia Enddocrina

Si definisce gozzo semplice o non tossico un ingrossamento della tiroide non conseguente a processi infiammatori o neoplastici. Sebbene spesso sia da ricondursi a cause specifiche (ridotta sintesi di ormoni tiroidei per deficit di iodio o difetti di biosintesi) nella maggior parte dei casi la sua eziologia risulta ignota.
Dal momento che le metalloproteinasi (MMPs) sono enzimi proteolitici in grado di degradare i componenti della matrice extracellulare (ECM) e la membrana basale, ormai noto è infatti il loro ruolo in processi patologici quali l'invasività delle masse tumorali nei confronti dei tessuti circostanti e la metastatizzazione, è ipotizzabile che esse giochino un ruolo chiave nel determinare la crescita volumetrica dei gozzi. Sono stati descritti due polimorfismi nelle regioni dei promotori di due MMPs: il polimorfismo 1G/2G nel promotore della collagenasi interstiziale (MMP1) e il polimorfismo 5A/6A nel promotore della stromelisina 1 (MMP3).; gli alleli 2G e 5A sembrano determinare un'attività trascrizionale significativamente più elevata.
Abbiamo quindi studiato la distribuzione dei polimorfismi 1G/2G e 5A/6A in 68 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per gozzo che provocava o semplicemente problemi estetici per eccessive dimensioni, o sequele meccaniche quali compressione e spostamento di trachea o esofago. I risultati ottenuti dal gruppo di pazienti sono stati confrontati con quelli di una popolazione di controllo. Per quanto riguarda il polimorfismo di MMP1 abbiamo riscontrato una frequenza significativamente maggiore nel gruppo di pazienti rispetto alla popolazione di controllo sia del genotipo 2G/2G (1G/1G: 13 vs 33; 1G/2G: 29 vs 70; 2G/2G: 26 vs 30 pazienti vs controlli; p=0.019) sia dell'allele 2G (frequenza allelica: 0.60 nei pz vs 0.49 nei controlli; p=0.0048). Al contrario la distribuzione del genotipo 5A/5A e dell'allele 5A di MMP3 non appare significativamente differente nel gruppo di pazienti rispetto alla popolazione di controllo.
In conclusione i nostri risultati sembrano confermare un importante ruolo di MMP1 nel determinare la capacità di crescita del gozzo, mentre non si evidenzia alcuna influenza di MMP3 nel medesimo processo patologico.

043

CYP2D6*4 GENOTYPING: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN TWO DIFFERENT PCR/RFLP METHODS.

Palmi I.[1], Scordo G.[2], Zuccaro P.[1], Pacifici R.[1]

1 Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma
2 Department of Medical Sciences, Clinical Pharmacology, Uppsala University Hospital, (Sweden)

Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) is the best documented example of a genetic polymorphism of the oxidative enzymes. CYP2D6 metabolizes 25-30% of all clinically used medications. CYP2D6 polymorphism allows division of the population into three phenotypes: extensive (EM), poor (PM) and ultrarapid metabolizers (UM). The PM condition may lead to an excessive or prolonged therapeutic effect or drug-related toxicity after a normal dose, conferring a genetic predisposition to drug induced adverse effects. The most common allele associated with the PM phenotype is CYP2D6*4 characterised by a defective splicing between the intron 3 and the exon 4, leading to production of inactive enzyme. Individuals can carry no, one or two CYP2D6*4 alleles. In this study, a new simple and specific PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) procedure was developed to detect the CYP2D6*4 allele. The forward (5′-CTTCTCCGTGTCCACCTTGC-3′) and reverse (5′-GATCACGTTGCTCACGGCTT-3′) primers were created based on published sequence. PCR product was digested with MvaI. We introduced an internal cleavage site for restriction enzyme: the presence of the constitutive cleavage site improves the accuracy of the test, controlling the efficiency of the restriction reaction. The fragments produced were 161, 56 and 31 bp for the wild type sequence, 216 and 31 bp for the variant allele. To evaluate procedure's efficacy, it was compared with standardised protocol described above (1). Fifty samples were analysed by the two methods. Forty (80%) subjects carried no CYP2D6*4 allele, 9 (18%) subjects carried one and 1 (2%) subject carried two mutated alleles. The results were consistent with previous findings among Caucasians. For one sample there was discordance between methods, since it resulted *4/*4 by standardised protocol, and *1/*4 by new procedure. Reasons for this discrepancy will be addressed in further studies. MvaI restriction analysis to evaluate the presence of CYP2D6*4 could be easily be introduced into a large number of laboratories. However, in order to assess method robustness, the analysis of a greater number of samples is advisable. The proposed method, is rapid, does not require confirmatory tests, and can be useful for screening for CYP2D6*4 presence in pharmacogenetic research.

1) Smith C., et al. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. Lancet (1992); 339:1375-1377.

044

ANALISI MOLECOLARE DEL GENE SLC26A3 E DISCORDANZA GENOTIPO-FENOTIPO IN TRE CASI SPORADICI DI CLORIDORREA

[1]G. Cardillo., [1,3]G. Castaldo, [2]R. Berni Canani., [2]G. Terrin, [2]P. Cirillo, [4]S. Gupta, [1]F. Salvatore.

[1]Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Univ. di Napoli "Federico II" and CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli; [2]Dip. di Pediatria, Univ. di Napoli "Federico II"; [3]Facoltà di Scienze, Univ. del Molise, Isernia, Italy; [4]James Whitcomb Riley Hospital for Children, Indiana University, Indianapolis.

La Cloridorrea (CLD) è una rara malattia autosomica recessiva che si manifesta con diarrea profusa con alta concentrazione di Cl^- e gap cationico di Na^+ e K^+. La CLD è dovuta a mutazioni nel gene SLC26A3 che codifica un canale ionico intestinale. Abbiamo studiato 3 pazienti CLD, due italiani e uno di origine sud africana, utilizzando DHPLC e sequenziamento diretto; nessuno studio precedente è noto su pazienti di queste popolazioni. Nel paziente 1, abbiamo rilevato due nuove mutazioni missense eterozigoti: Q495H e A547E. Nel paziente 2, mediante Long PCR e Walking Primer, abbiamo rilevato una nuova delezione di 1752 bp che elimina l'esone 18 in omozigosi. Nel paziente 3 abbiamo rilevato ben 4 nuove varianti omozigoti: T510M, S645P, IVS10nt–11insT e IVS13nt–79del2ins12. Le mutazioni del paziente 1 cadono in 2 hotspots caratteristici di analoghi casi sporadici di CLD. La Q495H impedirebbe il corretto folding dell'ultima elica transmembrana e la A547E coinvolge il dominio "STAS-like", coinvolto nella fosforilazione regolativa del canale. Il genotipo "severo" contrasta con il fenotipo lieve osservato nel paziente. Inoltre, il paziente 1, trattato con butirrato, ha mostrato la completa remissione dei sintomi (1). Nel paziente 2 la delezione dell'esone 18 provoca la perdita di un terzo del dominio STAS-like e del dominio PDZ, necessario per la topogenesi cellulare. Anche il soggetto 2 ha un fenotipo lieve. Il soggetto 3 ha un genotipo molto complesso. La mutazione T510M cade in un tratto della proteina apparentemente non associato a nessun dominio funzionale. Al contrario, la mutazione S654P cade al centro del dominio STAS-like. In questo caso, il fenotipo del paziente è grave, così come prevedibile in base al genotipo. La discordanza genotipo-fenotipo osservato in due pazienti suggerisce che fattori ambientali o geni epistatici, ereditati in maniera indipendente dal gene malattia, possano modulare il fenotipo CLD o vicariare, almeno in parte, la funzione della proteina SLC26A3. Il genotipo complesso osservato nel paziente 3, nato da genitori appartenenti a gruppi etnici sudafricani distinti suggerisce la che in alcune aree geografiche, mutazioni del gene SLC26A3 potrebbero essere favorite da qualche effetto protettivo ancora non noto.

Il lavoro è stato supportato da fondi miur (prin 2002 e firb 2001) e fondi dell'università del molise.

Berni Canani R., Terrin G., Cirillo P., Castaldo G., Cardillo G., Salvatore F. Butyrate as an effective treatment of congenital Chloride Diarrhea. Gastroenterology. In press

045

GENETIC POLYMORPHISM OF METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE (MTRR) AS A RISK FACTOR FOR CORONARY ARTERY DISEASE

Botto N, Federici C, Manfredi S, Hellies A, Biagini C, Clerico A, Andreassi MG

Background: Recent studies indicated that the A66G polymorphism of the methionine synthase reductase (MTRR) gene is a genetic determinant for homocysteine concentration. However, little is known about its role in the risk of cardiovascular disease.
Aim: To investigate the relationship between the A66G polymorphism of the MTRR gene and the occurrence of coronary artery disease (CAD).
Methods: We evaluated the distribution of the A66G MTRR genotype in 434 angiographically characterized patients (270 with CAD and 164 with no-CAD).
Results: The frequencies of the A66G genotypes in the CAD group were significantly different from those of no-CAD group (20.4%, 50.0% and 29.6% vs 10.4%, 57.3% and 32.3% for AA, AG and GG, respectively; χ^2=7.431, π=0.2). Subjects with the 66AA genotype had a more than 2-fold increased risk of developing CAD (odds ratio=2.2, 95% confidence interval 1.2 to 3.9, p=0.008) compared with those who had the 66AG and 66GG genotypes. Furthermore, the 66AA genotype remained an independent risk after adjustment for the other common risk factors for CAD (odds ratio=2.3, 95% confidence interval 1.1 to 4.6, p=0.02).
Conclusions: Thus, our findings support the hypothesis that A66G polymorphism in the MTRR gene is an independent risk factor for the development of CAD.

046

POLIMORFISMI GENETICI DEL FVII DELLA COAGULAZIONE E RISCHIO DI IMA GIOVANILE

Rossi R.; Musino L.; °Partenza A.; °Barca M.; Bitti *PP; Carru C.; Deiana L.

Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari; °Laboratorio di Analisi"Zonchello", *Laboratorio di Tipizzazione Tissutale ASL n°3 Nuoro

È noto che il sistema emostatico è in grado di modulare il rischio di trombosi, e che alterazioni della funzione piastrinica e dei sistemi emocoagulativo e fibrinolitico, in parte geneticamente determinate, possono influenzare tale rischio.
Recentemente è stata osservata un'associazione tra polimorfismi del fattore VII (FVII) e rischio di infarto miocardio acuto (IMA). Per valutare l'influenza del gene del FVII sul rischio di IMA abbiamo analizzato il ruolo della variante funzionale R353Q e del polimorfismo intronico G73A su un gruppo di soggetti con IMA in età precoce.
Pazienti e metodi Lo studio caso-controllo comprendeva 71 giovani infartuati (M= 61, F= 10; età media 45,5±4,2) reclutati in diversi centri cardiologici della provincia di Nuoro, e 150 soggetti di controllo scelti in maniera random nella popolazione sarda. I genotipi sono stati assegnati mediante metodi di PCR-RFLP (1) e la significatività statistica è stata valutata attraverso il test del χ^2.
Risultati: La distribuzione genotipica per il polimorfismo R353Q era: RR 67,61%, RQ 29,58%, QQ 2,82% nei pazienti, e RR 71,33%, RQ 28%, QQ 0,67% nei controlli. Frequenze simili sono state ottenute per il polimorfismo intronico G73A. I due polimorfismi erano in linkage-disequilibrium nel 67,6% dei casi e nel 75,3% dei controlli.
Non abbiamo osservato differenze statisticamente significative né tra le frequenze genotipiche né tra le frequenze alleliche nei soggetti studiati (P>0,05). A causa del piccolo numero di donne nel gruppo dei casi non è stato possibile apprezzare differenze tra i sessi.
Conclusioni L'associazione tra polimorfismi del FVII e rischio ischemico cardiovascolare è controversa. Se infatti diversi autori riportano una riduzione della predisposizione all' IMA nei soggetti portatori delle forme alleliche rare Q e A, altri o non osservano variazioni del rischio o riferiscono un aumento dello stesso .
Le nostre osservazioni non evidenziano un effetto protettivo degli alleli rari Q ed A sul rischio di IMA, poichè la frequenza di tali alleli si mantiene simile nei casi e nei controlli. In conclusione dai risultati del nostro studio emerge una perdita di associazione tra IMA giovanile e i polimorfismi studiati R353Q e G73A.

(1) Peyvandi F. et al., British Journal of Haematology, 108:247-253; 2000.

047

PREVALENCE OF MYOSIN BINDING PROTEIN-C GENE MUTATIONS AND EVIDENCE OF AN ASSOCIATION WITH SYSTOLIC DYSFUNCTION AND END-STAGE PROGRESSION.

Girolami F°., Olivotto I*., Passerini I°., Vargiu D *., Cecchi F*., Torricelli F °.
(°) Unità Operativa Citogenetica e Genetica (*)Centro Regionale di Riferimento per le Malattie del Miocardio, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

Objectives: We studied the clinical and genetic features of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) caused by mutations in the Cardiac Myosin-Binding Protein C gene (MYBPC3) gene in a regional population in Central Italy.
Background: HCM is an autosomal dominant disorder characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, usually asymmetric and involving the interventricular septum. More than 140 mutations in nine different genes encoding sarcomere proteins have been identified in HCM patients. Mutations in MYBPC3 the represent the cause of HCM in about 15% of familial cases, and include mainly nonsense, insertion/deletion or splice-site as compared to missense mutations. Studies on Japanese and French families have shown that HCM caused by MYBPC3 mutations may have a delayed onset and is usually benign. However, genotype-phenotype relationship in other populations remains unclear.
Methods: All 35 exons of MYBPC3 were screened by DHPLC followed by automatic sequencing in 124 consecutive, unrelated patients with HCM. The diagnosis was based on two-dimensional echocardiographic identification of a hypertrophied, non dilated left ventricle, in the absence of another cardiac or systematic disease capable of producing the magnitude of wall thickening evident.
Results: Overall, we identified 22 MYPC3 mutations in 19 patients (a 15% prevalence). Fifteen mutations (68%) were novel (IVS18+1C>T, A522T, V771M, E165D, ins/del exon 25, V189I, G531R, D786Y, R273H, E334K, R470W, Y340X, A693S , IVS12+1G>A, IVS24-2A>G) and not detectable in 100 normal controls, thus excluding the possibility of polymorphisms; three patients (16%) had two mutations affecting MYPC3, a condition termed compound heterozygosis; specifically, these were A522T with V771M, E334K with R470W, and D786Y with A693S. Average age at diagnosis in the 19 patients was 41.3±14.6 years; 8 (42%) were female. Echocardiographic features and outcome were variable, and ranged from mild hypertrophy with total lack of symptoms to severe hypertrophy with severe outflow obstruction, to end-stage progression, to cardiac arrest. Of note, evidence of systolic impairment (ejection fraction <0.50) was present in a high proportion of patients (n=5, 23%; p<0.05 versus the overall study group).
Conclusions: In a regional HCM population from Central Italy, MYBPC3 mutations were common (15% of unrelated patients); were associated with a broad spectrum of clinical and echocardiographic manifestations, with a high prevalence of systolic impairment; and had different mechanisms (missense, nonsense, insertion/deletion, splice-site). Most of the mutations were novel including those found in the three patients with compound heterozygosis.

048

SCREENING GENETICO DELLE PRINCIPALI MUTAZIONI RESPONSABILI DI BETA TALASSEMIA: GENOTIPO E MCV DEI G.R.

Baritono E., Battaglia P., De Fanti E., Trevenzoli G*, Consolaro G.*, Schiavon R.

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia - (*) U.O. di Pediatria - A.S.L. 21 Legnago (VR)

INTRODUZIONE E' stata eseguita l'analisi genetica di screening per la valutazione dello stato di portatore delle principali mutazioni responsabili di beta talassemia Cd 39 (C->T) e IVSI-110 (G->A) in 828 ragazzi della scuola media con età compresa tra i 13 e 15 anni, presumibilmente sani, residenti nel territorio dell'A.S.L. 21 di Legnago.
METODI E' stato impiegato un metodo che si basa su PCR multiplex con principio ARMS (primers allele specifici) (1). Si sono testati campioni di DNA estratto da cellule della mucosa buccale. Si è valutata la distribuzione del valore di volume cellulare medio dei globuli rossi (MCV) in campioni di sangue di 150 individui normali con età compresa tra 13 e 15 anni, residenti nell'area compresa nel distretto di Legnago.
RISULTATI
A) ANALISI GENETICA

	Mutazione Cd 39 (eterozigote)	Mutazione IVS-110 (eterozigote)
389 Maschi	5 (0,6 %)	3 (0,36 %)
439 Femmine	12 (1,45 %)	7 (0,84 %)
TOTALE (828)	17 (2,05 %)	10 (1,2 %)

B) ANALISI FENOTIPO (MCV)

MCV (fL)	<79	80-83	84-87	88-91	>91
Controlli %	7,7	37,6	28,5	13	0

DISCUSSIONE
La frequenza di mutazioni responsabili dello stato di portatore di tratto beta-talassemico (3,25 %) nei casi testati non risulta elevata rispetto alla media nazionale (3-4%). Considerando il numero di individui microcitemici attraverso l'analisi del MCV ne deriva che il 4,45 % di microcitemici non sarebbero portatori delle mutazioni studiate. Tali casi vanno indagati a nostro avviso estendendo l'analisi genetica ad altre mutazioni meno comuni ma comunque responsabili di emoglobinopatie associate a difetti di produzione della catena beta globinica e/o alfa globinica.
(1) Fortina P., et al. PCR Methods and Applications, 1992, p.163-166.

049

HYPERMETHILATION OF THE CpG ISLANDS IN THE PROMOTER REGION OF THE GSTP1 GENE IN PROSTATE CANCER: A USEFULL DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKER?

Roberta Iori[1], Roberto Miano[2], Sergio Bernardini[1], Enrico Finazzi Agrò[2], Giampiero Palmieri [3], Sabrina Ballerini[1], Lorenza Bellincampi[1], Claudio Cortese[1], Giorgio Federici[1]

[1]Dept. of Internal Medicine-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy
[2]Dept. of Urology-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy
[3]Dept. of Pathology-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy

Purpose
Promoter hypermethylation of the GSTP1 gene is the most frequent DNA alteration in prostatic carcinoma and is correlated with loss of gene expression. The aim of our study was to investigate the potential diagnostic and prognostic value of such epigenetic DNA alteration in prostate cancer.
Experimental design
144 patients (mean age 68 yrs, range 52-80 yrs), undergoing 8-cores prostatic biopsies for a clinically suspected prostate cancer, were analyzed. Two different tissue samples were collected from the same area of the prostate and then divided for both the genomic DNA extraction and the pathological examination. Before analysis, the prostatic tissue samples were digested with the methylation sensitive restriction enzyme HpaII and then amplified by conventional PCR.
Results
Overall, prostate cancer was diagnosed in 66/144 (46%) patients. Considering only the tissue samples collected for molecular studies, prostate cancer was diagnosed in 42/144 patients and promoter hypermethylation of GSTP1 gene was detected on 31/42 of prostate cancer (sensitivity=74%) and 2/102 of negative specimens (specificity= 98%). A significant association between GSTP1 promoter hypermethylation and both the Gleason score ≥ 7 (Fisher's Exact P-value = 0.01) and the presence of grade 4 and/or 5 (Fisher's Exact P-value = 0.03) was found.
Conclusions
Promoter hypermethylation of GSTP1 gene is a highly specific but not a very sensitive marker of prostate cancer. Our data showed a significant association between the methylation status of the GSTP1 gene and the Gleason score and grade suggesting a potential prognostic value of this epigenetic DNA alteration.

050

ASSOCIATION OF PLATELET GLYCOPROTEIN IIb/IIIa POLYMORPHISM WITH CAD IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

Errigo A., Castagni A., Nieddu L., Bacciu A., Carru C., Deiana L., Pes G.M.

Institute of Clinical Biochemistry, University of Sassari

Familial hypercholesterolemia (FH) is a common autosomal dominant hereditary disease caused by defects in the LDL receptor gene, and characterised by premature coronary artery disease (CAD). In heterozygotes the age of onset of CAD and the severity of the clinical picture is highly variable and may depend on the interaction with genetic polymorphisms that increase the atherothrombotic risk. One of these polymorphisms is the T1565C variant (PlA1/A2) in the exon 2 of the ITGB3 gene leading to a proline for leucine substitution at position 33 in the human platelet GP IIIa antigen protein. The 1565C (PlA2) allele has been previously associated with platelet aggregation, hyper-coagulability and early myocardial infarction. We performed a study in 97 Sardinian FH patients (M=43, F=54), whose molecular defect was yet known, subdivided into 38 CAD positive and 59 CAD negative groups. The two groups were genotyped by a PCR-RFLP method.
The frequency of the 1565C allele of the GP IIIa gene, was significantly increased in CAD positive FH heterozygotes in comparison with the CAD negative group (23.7% vs 12.7% P=0.047). The genotype distribution in CAD-positive FH heterozygotes was 57.9%, 36.8%, and 5.3% for 1565TT, 1565TC and 1565CC, respectively. The frequency of 1565CC homozygotes was more than 3 times higher in CAD-positive FH subjects than in their CAD-negative counterpart. Due to the small sample size no statistical significance was found according to sex and type of LDL receptor mutations.
Conclusions: these preliminary findings suggest that the 1565C allele of GP IIIa platelet, especially when present in homozygosis, is positively associated with premature CAD in FH heterozygote patients.

051

C677T POLYMORPHISM OF THE METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE IS A RISK FACTOR OF ADVERSE EVENTS AFTER CORONARY REVASCULARIZATION

Botto N., Federici C., Manfredi S., Hellies A., Rizza A., Berti S., Bevilacqua S., Biagini A., Andreassi MG.

Background: A common point mutation (C677T) in the gene for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with hyperhomocysteinemia, an independent risk factor and a strong predictor of mortality in patients with coronary artery disease (CAD). The aim of this study was to investigate whether C677T polymorphism can be a predictor of major adverse cardiac events after myocardial revascularization.
Methods: We determined MTHFR genotype in 159 patients with CAD undergoing myocardial revascularization (72 percutaneous transluminal coronary angioplasty and 87 coronary artery bypass graft). Recurrent angina, non fatal myocardial infarction, target vessel revascularization, heart failure and cardiac death were considered major adverse cardiac events that occurred after discharge from index hospitalization.
Results: During the follow-up (6.9±0.3 months, mean±SEM) the composite endpoint accounted for 25.9%, 11.4%, and 4.3%, for TT, CT and CC genotype (log-rank statistic 5.2, p=0.02). Subjects with mutant TT genotype had a 3-fold increase of any cardiac event (hazard risk [HR]=3.0; 95% [CI], 1.1-8.1). In multiple variable regression Cox, predictors of events were TT genotype (HR=2.8; 95% CI, 1.01-7.62, p=0.047), low ejection fraction <40% (HR=4.5; 95% CI, 1.62-12.6, p=0.004) and revascularization procedure (HR=6.1; 95% CI, 1.86-20.34, p=0.003).
Conclusions: These data indicate that the TT genotype seems to be significantly associated with major adverse cardiac events after myocardial revascularization in CAD patients, suggesting a potential pathological influence of homocysteine in the clinical outcome.

052

AN INTERDISCIPLINARY APPROACH TO IMPROVE THE ETIOLOGIC DIAGNOSIS OF DEAFNESS IN INFANTS.

Patrosso MC[§], Lando G[§], Penco S[§], U Maldera[1°], M Mazzocca[1°], E Manfredini[§], Primignani P[*], Perroni L. ° Castorina P^, Luigina Spaccini^, Ambrosetti U.", Giorda R[#], Brambilla D[#], Lalatta F, Marocchi A[§.]

§ Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Patologia Clinica Analisi Genetiche Osp. Niguarda Ca' Niguarda - Italy
°[1] Struttura Complessa Otorinolaringoiatria Ospedale Niguarda Ca'Granda -Milano Italy
[#] Istituto Scientifico "E. Medea", IRCCS - Lecco Italy
*Laboratorio di Genetica Medica ICP - Milano Italy
° Laboratorio di Genetica Umana, Osp Galliera, Genova
^ Servizio di Genetica Medica, ICP Milano
" Istituto di Audiologia, Università di Milano.

About 60% of cases of infant deafness can be attributed to genetic defects which have an estimated prevalence of about 1/2000.
In 30% of patients with pre-lingual deafness other anomalies can be detected (syndromic forms), while isolated deafness is present in 70% (non-syndromic forms). Therefore genetic assessment is important in these patients once environmental factors (such as infections during pregnancy, traumas, drug administration, etc.) have been ruled out, to discriminate between a syndromic diagnosis or an isolated one. This is crucial for selecting the proper genetic test and counsel the parents and relatives.
In this regard three Medical Institutions have recently started a program where a team consisting of audiologists, clinical geneticists and molecular biologists review cases to diagnose and manage these patients. In a population of 500 individuals the syndromes identified included the Waandenburg, the Branchio-oto-renal, the Pendred, the Usher and correlated forms, the Treach- Collins (4% of cases). Specific management could be offered to these patients. Non syndromic forms (482 subjects) showed Cx26 causative mutations (8 AD) in 28 % and 16 patients showed only one mutation (3%).
Our results show a lower than expected prevalence of syndromic deafness indicating a probable selection in referral of these patients and the difficult identifications of these forms.
In the case of positive result for the Cx26 mutation we were able to counsel the family, provide an accurate assessment of genetic risk and offer the genetic test to relatives. Further analysis are in progress for the negative cases which were counseled about their genetic risk on the basis of family history and clinical diagnosis.
These results encourage us to continue in our multidisciplinary approach which should facilitate correct identification of etiology and improve clinical management.

053

FREQUENZA DI POLIMORFISMI LEGATI AL RISCHIO TROMBOTICO IN LICEO SCIENTIFICO CITTADINO

Sabatini L., Fineschi D., Pescaglini M ,. Raffaelli N., Gasparri L. ,Pasquoni ML.

U.O.C. Laboratorio di Ematologia e Coagulazione Az.Osp Un .Senese

La trombosi, da sola o associata a malattie cardiovascolari, è una delle cause fondamentali di infarto miocardio, stroke, embolismo polmonare e trombosi venosa profonda Molte anormalità genetiche provocano un aumento del rischio trombotico, e la presenza di più di una anormalità dà luogo ad un ulteriore rischio di trombosi. La disfunzione genetica dei componenti del sangue può essere dovuta a mutazioni che provocano una perdita di funzioni (loss-of-function) degli anticoagulanti naturali, o mutazioni che comportano acquisizione di funzioni (gain-of-function) delle proteine procoagulanti , anormalità che portano ad una diminuzione dell'azione fibrinolitica , o anormalità della funzione piastrinica associate ad un aumento dell'attivazione. Lo scopo di questo studio è di individuare soggetti ad alto rischio trombotico in una popolazione presumibilmente sana per attuare una una prevenzione su tali soggetti.
E' stato effettuato uno studio su un gruppo di 260 pazienti di cui 170 femmine e 90 maschi (età media 32,6 anni), costituito da studenti, personale docente e non docente di un liceo scientifico cittadino che avevano dato il loro consenso informato e volontario allo scopo di valutare la frequenza di omozigosi ed eterozigoti di alcuni polimorfismi legati al rischio trombotico, come FV Leiden (G1691A) , F II G20210A, MTHFR C677T, e PAI –I 4G/5G in una popolazione presumibilmente sana. Il metodo di analisi per tutti gli analiti testati si è basato sulla PCR del DNA genomico con primers specifici seguita da digestione enzimatica con enzimi di restrizione.
I risultati sono stati i seguenti: FV Leiden,11 eterozigoti (4,2%) di cui 6 femmine e 5 maschi , e 249 pazienti normali (95.8%)
FII : 8 eterozigoti (3,1%) di cui 4 femmine e 4 maschi, 252 pazienti normali (96.9%).
MTHFR C677T:130 eterozigoti (50%), di cui 85 femmine e 45 maschi , 64 omozigoti patologici (25%), di cui 40 femmine e 24 maschi
PAI-1 4G/5G :124 eterozigoti (48%) di cui 77 femmine e 47 maschi, 66 omozigoti patologici (25.4%) di cui 44 femmine e 22 maschi.
I risultati dimostrano che la popolazione dell'area senese non è maggiormente protetta dal rischio trombotico rispetto ad altre realtà territoriali. La frequenza percentuale di eterozigoti per il FII è maggiore rispetto ai dati riportati in letteratura. Questo dato dimostra la necessità di effettuare un'educazione preventiva del rischio trombotico nella popolazione giovanile.
Salomon O,Steimberg DM, Zivelin A .Arter, Throm and Vasc Biology .1999,19:511-518

054

GENOTIPIZZAZIONE DI SNP MEDIANTE MICROARRAY: NUOVO APPROCCIO CON IMPIEGO DI SCANNER A DOPPIO LASER

Pellegrini S.; Galfré S.; Cozza A.; Franceschini C.; Mariotti V.; Pietrini P.

Centro Interdipartimentale di Ricerca di Genetica Molecolare e Clinica, Università di Pisa.

Lo studio dei polimorfismi sta assumendo un ruolo sempre più importante nel determinare il contributo genetico allo sviluppo di quelle malattie che non sembrano avere una trasmissione genetica semplice. L'identificazione di fattori di rischio genetico contribuisce a determinare marcatori biologici di malattia che possono essere utilizzati per una diagnosi precoce. Per avere maggiore probabilità di identificare fattori genetici di rischio è essenziale riuscire a valutare il numero più alto possibile di varianti genetiche. Utilissimi a questo scopo sono i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) presenti nel genoma umano con una frequenza di uno ogni 1000 pb. Questo fa sì che a carico di ogni sequenza di interesse, ad esempio quella di ogni gene candidato, sia possibile analizzare, per una ipotetica associazione con una malattia, un numero elevato di polimorfismi. In questo lavoro proponiamo un approccio per la genotipizzazione degli SNP, basato su una reazione di Single Base Extension (SBE) seguita da ibridazione su microarray che, a differenza di altri metodi pubblicati, utilizza per l'acquisizione e l'analisi delle immagini degli array, uno scanner a doppio laser anzichè un tetra laser, sistema molto più costoso. Nel metodo da noi proposto, per l'identificazione di tutte e quattro le basi, ciascun campione di DNA deve essere ibridizzato su due array: uno per verificare la presenza, nel locus dello SNP, della base A marcata con Cy5 o della T marcata con Cy3, l'altro per verificare la presenza della C marcata con Cy5 o della G marcata con Cy3. Per ottenere una valutazione globale della frequenza con cui ciascun singolo allele è presente nella popolazione studiata, tuttavia, è necessario fare un confronto quantitativo dei segnali registrati sui due array. Per ragioni tecniche, durante la fase sperimentale vi è il rischio che venga introdotta una certa variabilità intrinseca nei segnali, che può compromettere l'attendibilità dei dati finali estratti. Per eliminare questo problema, abbiamo messo a punto un metodo che prevede l'utilizzo, per ciascun campione, di un terzo array, in cui si ibridizzano prodotti di SBE ottenuti con l'impiego contemporaneo di tutte e quattro le basi marcate, due con Cy5 e due con Cy3. I segnali registrati da questo array sono utilizzati come riferimenti quantitativi per confrontare l'intensità dei segnali presenti sugli altri due array. Con l'utilizzo del terzo array abbiamo osservato un miglioramento significativo nell'analisi dei dati in termini di sensibilità e di specificità, in quanto si riduce notevolmente, nel caso degli eterozigoti, il numero di segnali difficilmente interpretabili.

055

HOMOCYSTEINE DETERMINANTS IN PATIENTS WITH ADVANCED CORONARY AND/ OR VALVULAR HEART DISEASE

Federici C.; Botto N.; Storti S.; Hellies A.; Manfredi S.; Biagini A.; Clerico A.; Andreassi M.G.;

Laboratory of Cellular Biology, CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Background: High homocysteine (Hcy) levels has been identified as an independent risk factor for atherosclerosis and can be modulated by genetic as well as nutritional factors.
Aim: To evaluate determinants of homocysteinemia in a population of adult cardiac surgery patients.
Methods: We studied 186 hospital patients (154 men; age: 57±10 years) admitted to our cardiac surgery unit for advanced coronary artery disease (n=151), valvular heart disease (n=20), or both (n= 15). Plasma levels of homocysteine, vitamin B_{12} and folate were assessed by using immunoassay systems. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR, C677CT and A1298C) and the methionine synthase reductase (MTRR, A66G) genes were evaluated by PCR/restriction fragment length polymorphism analysis.
Results: Hcy levels (range=4.1-59.1; median=12.5 μmol/L) was significantly and positively correlated to age (p=0.002), gender (p=0.007), as well as the mutant 677TT genotype for MTHFR gene (p=0.02), while negatively to concentrations of folate (p=0.001) and vitamin B_{12} (p=0.002). A significant interactive effect (p<0.0001) was also observed between C677CT MTHFR polymorphism and low levels of folate (<3.1 ng/ml).
On multiple regression analysis, only age (1-year increment) [OR=1.1 (95 % CI, 1.0-1.1), p=0.003], mutant 677TT MTHFR polymorphism [OR=2.8 (95 % CI1.1-6.), p=0.03], and plasma levels of folate (1-ng/mL increment) [OR=0.8 (95 % CI, 0.6-0.9) p=0.01], remained indipendent determinants of Hcy levels above the study median.
Conclusion: Major determinants of tHcy in ischemic heart disease are genes (the mutant 677TT genotype for MTHFR gene) and – to a greater extent - the modifiable plasma pool of folate.

056

POLIMORFISMO DI MMP3: POSSIBILE FATTORE PROTETTIVO PER L'IPERTENSIONE POLMONARE NELLA SCLERODERMIA SISTEMICA

Battaglioli L*. Erario M.*, Marasini B.**, Biondi M.L*, Guagnellini E*

* Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ** Dipartimento di Medicina Interna Università degli Studi di Milano Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano

La Sclerodermia (SSC) è una malattia cronica autoimmune caratterizzata da una obliterazione vascolare e da fibrosi della cute e degli organi interni. Gli organi principalmente colpiti sono i polmoni con conseguente ipertensione dell'arteria polmonare (PAH), principale causa di morbilità e mortalità. Dal momento che esistono farmaci efficaci nel controllo dell'ipertensione polmonare, risulta molto importante individuare precocemente i soggetti con SSC a rischio di PAH. La patogenesi della PAH come anche della SSC non è ancora del tutto chiara. Recenti studi hanno suggerito che la PAH potrebbe essere determinata da fattori genetici. Un rimodellamento vascolare inappropriato, con conseguente fibrosi e ostruzione delle piccole arteriole polmonari è caratteristica principale della patogenesi della PAH, e le Metalloproteinasi (MMPs), una famiglia di enzimi di degradazione importanti nel mantenimento dell'integrità dei vasi sanguigni è implicato nel rimaneggiamento fisiologico e patologico dei tessuti. La MMP3, detta Stromelisina, appartenente al gruppo delle MMPs è implicata nell'eccessivo accumulo di matrice extracellulare. Recentemente è stato descritto un polimorfismo 6A/6A nella regione del promotore che porta ad una sua ridotta attività con conseguente diminuzione dell'espressione di MMP3. Questo potrebbe essere responsabile della ridotta degradazione della matrice extracellulare. Recentemente abbiamo trovato un'associazione tra l'allele 6A della MMP3 e lo sviluppo di SSC. Abbiamo quindi fatto uno studio genetico per vedere se il polimorfismo di MMP3 sia coinvolto nella PAH associata a SSC. Abbiamo studiato 99 pazienti con SSC. La pressione arteriosa polmonare (PAP syst) è stata determinata mediante Ecocardiografia Doppler. L'ipertensione polmonare è definita come PAP>30 mmHg. Il polimorfismo del gene è stato studiato mediante sequenziamento del DNA. La differenza fra i due gruppi è stata esaminata mediante il test X^2. L'Odds ratio è stato calcolato come indice di associazione del genotipo MMP3 con il fenotipo. Dei soggetti con PAP<30 mmHg, 9 sono risultati 5A/5A, 24 5A/6A e 23 6A/6A, mentre fra i soggetti con PAP>30mmHg, 10 sono risultati 5A/5A, 54 5A/6A e 9 6A/6A. La distribuzione del genotipo è risultato differente fra il gruppo con PAH e quello senza. E' stata osservata una correlazione fra l'omozigosi 6A/6A con il sottogruppo con PAH, OR 2.3 (0.87-6.25); p=0.062. A conferma della correlazione fra l'omozigosi 6A/6A e ridotto rischio di PAH la pressione media di questo gruppo è statisticamente più bassa rispetto ai soggetti 5A/5A+5A/6A. Questi dati suggeriscono che un polimorfismo della Stromelisina potrebbe avere un ruolo protettivo nello sviluppo della PAH associata a SSC.

057

XRCC-1 GENE POLYMORPHISMS, NOT XRCC-3 OR CYTOCHROME P450, MIGHT PREDISPOSE TO PANCREATIC CANCER.

Falda A., Navaglia F., Zambon C.-F.*, Fogar P.*, Gallo N., Greco E., Bonvicini P., Basso D., Pedrazzoli S.*, Plebani M.

Department of Laboratory Medicine and *Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

Background: An individual predisposition to cancer might be searched in polymorphisms of genes involved in DNA repair, as X-Ray Cross-Complementing (XRCCs), or involved in carcinogens activation, as Cytochrome p450 (CYP1A1). Our aims were to: 1. ascertain whether there was any association between the the XRCC1+22163 C/T (Arg194Trp), XRCC1+24011 G/A (Arg399Gln), XRCC3+16064 C/T (Thr241Met) or CYP1A1+4889 A/G (Ile462Val) polymorphisms and PC; 2. verify any correlation between the serum levels of vitamins A and E and PC cancer diagnosis, staging, grading and survival. Patients and Methods: We studied 91 PC patients and 29 chronic pancreatitis (CP). Survival was available for 44 PC. The genetic polymorphisms were analysed by RFLP. Serum vitamins A and E were measured by an HPLC procedure. Results: XRCC1+22163 C/T, XRCC3+16064 C/T and CYP1A1+4889 A/G were not correlated with diagnosis. None polymorphism was correlated with tumor stage, tumor grade, or the onset of metastases after surgery. Survival was influenced only by stage (Log rank=12.4, $p<0.01$). Vitamins A and E levels did not significantly differ between PC and CP. Vitamin A was significantly lower in stage III-IV (556 + 53 nmol/L, mean + SE) than stage I-II PC (896 + 112)($t=3.08$, $p<0.01$). The lowest serum levels of vitamin E were in PC patients who developed liver or local metastases after surgery (10.71 +1.4 □mol/L, mean + SE), with respect to those who developed lung metastases (22.2 + 2.9)($F=8.41$, $p<0.01$). Conclusions: XRCC1+22163 C/T polymorphism seems involved in favouring PC in subjects with less than 60 yrs; these effects might be consequent to an altered protein efficiency in DNA repair; the antioxidant vitamins A and E might partly counteract tumor growth and spread.

058

IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI GENICHE NEL GENOMA DI HBV CORRELATE A RESISTENZA AL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Guarneri P., Poma F., Turconi P., Tebaldini O., Lattuada L., Marin M.G.

Laboratorio di Biologia Molecolare, Centro Analisi Fleming, Brescia

Obiettivi: Messa a punto di un metodo di sequenziamento per la valutazione dell'eventuale presenza di mutazioni geniche responsabili della resistenza al trattamento farmacologico con lamivudina e famciclovir. **Metodologia:** I campioni di siero congelato vengono sottoposti ad un processo di estrazione di DNA mediante lisi cellulare in presenza di proteinasi K (Qiamp DNA Mini-Kit, QIAGEN). Il DNA estratto viene amplificato mediante PCR con una coppia di primers, disegnati all'interno del gene codificante per la DNA polimerasi virale, che genera un prodotto di PCR di 400 bp. I campioni vengono successivamente sottoposti a sequenziamento enzimatico (ABI Prism Big-Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e i prodotti della reazione separati per elettroforesi capillare mediante sequenziatore automatico (AB Prism 310 Genetic Analyzer). La sequenza nucleotidica ottenuta viene analizzata mediante il programma Bioedit, (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) ottenendone la corrispondente sequenza aminoacidica nei tre possibili frames di lettura. Viene quindi valutata la presenza di eventuali sostituzioni aminoacidiche in determinate posizioni della proteina virale correlate con la resistenza al trattamento con lamivudina e famciclovir (L528M, M552V/I). (1) **Risultati**: Da ottobre 2001 sono stati analizzati 90 campioni HBV-DNA positivi, 45 (50%) dei quali sono risultati privi di mutazioni nei siti di resistenza. Per gli altri 45 campioni sono state identificate diverse mutazioni: nel 18,9% dei casi erano presenti contemporaneamente le mutazioni M552V e L528M, mentre la mutazione M552I è stata riscontrata nel 13,3% dei casi; nel 5,6% dei campioni sono risultate presenti contemporaneamente le mutazioni M552I e L528M. Con minor frequenza sono state evidenziate anche altre mutazioni, la cui eventuale correlazione con l'instaurarsi di farmacoresistenza è stata valutata mediante ricerca di fonti bibliografiche (www.ncbi.nih.nlm.gov/pubmed) **Considerazioni**: L'impiego di analoghi nucleosidici, tra cui la lamivudina, nel trattamento dell'infezione da HBV, è limitata dalla comparsa di mutazioni geniche responsabili di farmacoresistenza. La possibilità di sequenziare una porzione del genoma di HBV all'interno della quale compaiono tali mutazioni costituisce un valido metodo diagnostico per la valutazione di un eventuale fallimento terapeutico.

1. Xiong X, Yang H, Westland CE, Zou R and Gibbs CS. In vitro evaluation of hepatitis B virus polymerase mutations associated with famciclovir resistence. Hepatology 2000; 31:219-224

059

IDENTIFICATIONS BY DHPLC OF NOVEL MUTATIONS IN THE ABCR GENE ASSOCIATED WITH STARGARDT DISEASE IN ITALIAN PATIENTS

I.Passerini[2], A.C. Sodi[1]F.,Girolami[2], U.Menchini[1], F.Torricelli[2]

[1]Eye Clinic, Univ of Florence, Florence, Italy;
[2]Cytogenetics and Genetics Unit, Azienda Ospedaliera Careggi, Florence, Italy.

Purpose: Stargardt disease (STGD) is a progressive juvenile-to-young adult-onset macular degeneration, characterized by severe reduction of central visual acuity and normal peripheral vision. STGD is predominantly inherited as an autosomal recessive trait; even if autosomal dominant forms have been described. Homozygous and compound heterozygous mutations in the ABCR gene are responsible for recessive Stargardt macular dystrophy. In this study we determined the mutation spectrum in the ABCR gene in a group of Italian patients with autosomal recessive Stargardt disease .**Methods:**Thirteen families from central Italy , some members of which were affected by autosomal recessive STGD, were clinically examined. All 50 exons of the ABCR gene were screened by DHPLC and direct sequencing techniques.**Results:** In all patients we reported some mutations of ABCR gene . Some of them have been already described and among them Gly1961Glu was the most frequent in our series. Seven novel mutations were identified:three missense mutations (Thr970Pro, Phe1015Ile and Leu2221Pro); two nonsense mutations (Cys1177Stop and Trp1408Stop); two small deletions (5905delG and 6636delA). The missense mutations were not detected in 150 unaffected control individuals of Italian origin.**Conclusions:**Some novel mutations in ABCR gene in STGD patients were reported. These data confirm the extensive allelic heterogeneity of the ABCR gene, in agreement with previous observations in patients with Stargardt disease from Italy. The frequent report of novel mutations is probably related to the great number of exons in the ABCR gene, which favours rearrangements in DNA sequence.
Ref.Allikmets et al., 1997, Science, 227,1805

060

DIAGNOSI DI MUTAZIONE FMR-1/ X-FRAGILE IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA RITARDO MENTALE

Battaglia P., Grimau-Merino* R., De Fanti E., Baritono E., Schiavon R.

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia – Settore di Biologia Molecolare e Citogenetica – (*) Servizio di Neuropsichiatria Infantile - A.S.L.21 Legnago (VR)

INTRODUZIONE La sindrome X-Fragile è una delle più comuni forme di ritardo mentale ereditario, essendo stimati 1 affetto ogni 4000 maschi e 1 ogni 6000 femmine (1). La singolare mutazione del gene FMR-1 (Xq27.3) consiste nell'amplificazione di numero di copie di triplette CGG (nel normale quantificate 29-30; da 50 a 200 quadro definito "premutazione"; > 200 quadro definito "mutazione piena").
CASISTICA La nostra casistica comprende 237 bambini (158 maschi e 79 femmine) di età compresa tra 2 e 15 anni, selezionati dai Medici della Neuropsichiatria Infantile della nostra A.S.L.21 di Legnago (Sud-Est di Verona), per i quali veniva richiesta l'analisi genetica di FMR-1 per sospetta sindrome X-Fragile.
METODI L'indagine è stata eseguita nel periodo di 8 anni dal 1996 al 2003 con una media di circa 30 casi l'anno. La nostra metodologia prevede l'esecuzione di un preliminare test di screening in PCR su DNA estratto da linfociti periferici. Il ricorso ad un secondo test più specifico con impiego di sonda di ibridazione (Southern Blotting) viene deciso nei seguenti casi: A) La PCR riconosce alterazioni che vanno confermate. B) La PCR è poco informativa (casi di femmine con due alleli indistinguibili per simile numero di copie CGG). C) La PCR non evidenzia anomalie ma c'è forte sospetto clinico di s. X-Fragile. D) Richiesta di indagini di mosaicismi.
RISULTATI

	n(CGG) > 200 casi (%)	n(CGG)= 50 – 200 casi (%)	Mosaico casi (%)
158 MASCHI	9 (3,8)	4 (1,7)	2 (0,8)
79 FEMMINE	4 (1,7)	1 (0,4)	//

DISCUSSIONE La nostra indagine ha messo in evidenza anomalie del gene FMR-1 nel 8,4 % dei soggetti testati. Tali dati sono leggermente superiori a quelli riportati in letteratura sull'argomento (3-6%). Questo è dovuto a nostro avviso alla attenta selezione dei soggetti con sospetta sindrome X-Fragile operata dai medici neuropsichiatri. Si sottolinea l'importanza di eseguire la ricerca di mutazione del gene FMR-1 in bambini affetti da deficit neuro-psichici e/o difficoltà di apprendimento perché, come visto dal numero di casi portatori di mutazione piena, una buona percentuale riconosce una causa genetica.
(1)Oostra B.A. A fragile balance:FMR1expression levels
Human Molecular Genetics,2003, Vol.12, R249-R257.

061

MOLECULAR SCREENING OF MONOGENIC HYPERCHOLESTEROLEMIAS IN SARDINIA

Pes G.M.[1], Errigo A.[1], Petrazzini A.[2], Deligios M.[1], Bertolini S.[3], Carru C.[1], Deiana L.[1]

[1]Institute of Clinical Biochemistry, University of Sassari
[2]Clinical Nutrition Unit, ASL n. 3, Nuoro
[3]Dept. Internal Medicine, University of Genova - Italy

Autosomal dominant familial hypercholesterolemia (FH) and autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) are the two most common genetic disorders associated with elevated levels of cholesterol in the Sardinian population.
Objective: to develop rapid, PCR-based molecular tests for the screening of the most frequent FH- and ARH-causative mutations in this population.
Methods: a series of PCR-RFLP assays using 3'-mismatched primers were developed for nine different LDL receptor gene mutations (1 microdeletion: 1778delG; one nonsense mutation: E579X; five missense mutations: C95R; D118N; C255W; A378T; T413R; two splicing mutations: g>a +1 Int3; g>a -10 Int11) and two ARH gene mutations (G65A, 432insA) previously reported in Sardinia. We evaluated the reliability of these assays by amplifying DNA samples collected from 74 FH and 8 ARH Sardinian families.
Results: the PCR assays allowed us to detect one or two defective alleles in 37% and 100% of FH and ARH samples, respectively. In addition, the tests identified 39 ARH carriers (G65A, n=22; 432insA, n=17) among the first degree relatives of the ARH probands. The DNA sequencing, performed on all mutated alleles, showed 100% concordance with the results of the PCR assays.
Conclusions: the tests developed are rapid and reliable and represents a valid alternative to DNA sequencing for the molecular characterization of FH and ARH patients as well as for the screening of ARH carriers in the Sardinian population.

062

QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE PRV-1 MEDIANTE REAL TIME PCR IN SOGGETTI CON POLICITEMIA VERA: RISULTATI PRELIMINARI

Besana S., Perego D(1)., Molteni P., Fioratto R., D'Alessandro P., Pighi P., Signorini S., Mocarelli P.

Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio e (1) Divisione di Medicina Ospedale di Desio, Desio (Mi).

Introduzione: La Policitemia Vera (PV) è un disordine mieloproliferativo cronico (prevalenza 0.4/1000) caratterizzato dalla proliferazione clonale dei precursori ematopoietici con aumentata produzione di eritrociti [1]. In assenza di markers patognomonici di malattia, la diagnosi si basa su criteri clinici e di laboratorio (esame emocromocitometrico) che non distinguono tra forma primaria e secondarie. Recentemente è stato evidenziato un aumento dell'espressione del gene PRV-1 (Policitemia-Rubra-Vera) nei leucociti di soggetti con PV, anche se con risultati variabili secondo la popolazione cellulare utilizzata (leucociti totali, linfociti o granulociti) [2].
Scopo: Valutare l'espressione del gene PRV-1 in linfociti e granulociti di soggetti con PV.
Materiali e metodi: Da Febbraio 2004 sono stati finora analizzati i campioni di 10 pazienti con PV, in cura presso la Divisione di Medicina del nostro ospedale, e di 10 controlli.
La separazione di linfociti e granulociti da 10 mL di sangue intero in EDTA è stata effettuata rispettivamente mediante Ficoll-Paque™ (Amersham) e soluzione Percoll al 62% (Amersham). Linfociti e granulociti (risospesi in RPMI, FCS e DMSO) sono stati conservati in azoto liquido fino all'estrazione dell'RNA eseguita con TriReagent (Sigma Aldrich). L'espressione del gene PRV-1 è stata valutata tramite real time RT-PCR (sonde TaqMan), utilizzando la β-actina come gene di riferimento (Human β-actin; Applied Biosystems).
Risultati: I dati preliminari evidenziano una maggiore espressione di PRV-1 nei granulociti di pazienti PV rispetto ai controlli pur senza raggiungere significatività statistica per la bassa numerosità. L'espressione di PRV-1 si conferma maggiore nei granulociti rispetto ai linfociti.
Conclusioni: I nostri risultati, che necessitano di una verifica su una casistica maggiore (in corso), sembrano indicare che l'espressione di PRV-1 nei granulociti potrebbe rappresentare un possibile marcatore utilizzabile nella diagnosi differenziale di PV. Un recente studio [3] suggerisce il possibile utilizzo di leucociti totali per tale determinazione anziché dei granulociti la cui separazione richiede tempo e presenta alcune difficoltà tecniche. A completamento del nostro studio verrà effettuato anche un confronto dell'espressione tra granulociti e leucociti totali.

Bibliografia: [1] Ann Intern Med 2003; 139: 470-5. [2] Blood 2003; 102: 3569-3574. [3] Cin Chem 2004; 50: 644-647.

063

RICERCA DI HPV DNA E TIPIZZAZIONE DEL CEPPO VIRALE MEDIANTE L1 CONSENSUS PCR E SEQUENZIAMENTO GENICO

Poma F., Guarneri P., Turconi P., Tebaldini O., Lattuada L., Marin M.G.

Laboratorio di Biologia Molecolare, Centro Analisi Fleming, Brescia

Obiettivi: Messa a punto di un metodo diagnostico altamente sensibile e specifico per l'identificazione del maggior numero possibile di tipi di Human Papillomavirus (HPV) in campioni biologici. **Metodologia:** I campioni (tamponi vaginali, tamponi endocervicali, tamponi uretrali, liquido seminale) sono sottoposti ad un processo di estrazione di DNA mediante lisi cellulare con proteinasi K (Qiamp DNA Mini-Kit, QIAGEN). La presenza di HPV DNA nel campione viene valutata mediante L1 consensus PCR (1) basata sull'impiego della coppia di primers degenerati MY09/MY11, disegnati in una regione altamente conservata del gene L1 (HPV Screening L1, Amplimedical). I prodotti di PCR positivi (450 bp) sono sottoposti ad una reazione di sequenziamento enzimatico (ABI Prism Big-Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e separati mediante elettroforesi capillare al fine di ottenerne la sequenza nucleotidica, mediante sequenziatore automatico (AB Prism 310 Genetic Analyzer). La sequenza ottenuta viene inserita in banca dati (www.ncbi.nih.nlm.gov/blast) per il riconoscimento del tipo di HPV e, conseguentemente, vengono ricercate fonti bibliografiche relative al rispettivo potenziale oncogeno (www.ncbi.nih.nlm.gov/pubmed) **Risultati**: Da aprile 2003 sono stati testati 206 campioni: 108 (52%) sono risultati HPV-DNA positivi e sono stati sequenziati. Sono stati identificati 22 tipi diversi di HPV, il 62% dei quali è stato classificato come tipo ad alto rischio e il 21% a basso rischio; per il rimanente 17% l'appartenenza alla classe di rischio risultava variabile in funzione del riferimento bibliografico. **Considerazioni**: Data la continua scoperta di nuovi tipi di HPV con diverso potenziale oncogeno, l'utilizzo di questo sistema diagnostico che permette l'amplificazione, con una singola reazione, di molti tipi di HPV, consente la tipizzazione di vari ceppi virali, anche di recente scoperta, e la valutazione del grado di correlazione con lesioni tumorali (grado di rischio), in base a informazioni bibliografiche costantemente aggiornate.

1. Nelson JH, Hawkins GA, Edlund K, EvanderM, Kjellberg L, Wadell G, Dillner J, Gerasimova, Coker AL, Pirisi L, Petereit D, Lambert PF: A Novel and Rapid PCR-Based Method for Genotyping Human Papillomaviruses in Clinical Samples. J Clin Microb 2000;38:688-695

064

SUICIDE GENE THERAPY OF PANCREATIC CARCER WITH CYTOSINE DEAMINASE: A PROMISING IN VITRO TOOL

Fogar P., Gallo N.*, Navaglia F.*, Basso D.*, Greco E.*, Zambon C.-F., Falda A.*, Durante C.*, Pasquali C., Sperti C., Pedrazzoli S., Plebani M.*

Departments of Medical and Surgical Sciences and *Laboratory Medicine, University of Padova, Italy.

Background: gene therapy is a novel approch for pancreatic cancer (PC) treatment, and the insertion in the host genome of suicide genes seems somewhat promising. Among them cytosine deaminase (CD) is able to convert the 5-fluorocytosine (5-FC) into 5-fluorouracile (5-FU). Aim: to ascertain in vitro whether CD or CD joint to 5-phosphoribosiltransferase (5PRT) gene transfer to a series of pancreatic cancer cell lines allows their killing by 5-FC treatment. Methods: three pancreatic cancer cell lines (CAPAN-1, MIA PaCa 2, PANC-1) were chemically transfected with two plasmid vectors containing both a neo-selectable marker gene and a mammalian constitutive promoter (RSV) and CD (pRSV-CD) or CD+5PRT (pRSV-PRT) from Saccaromyces cerevisiae. Stable transfected cell lines were selected by G418 treatment. Each parental, pRSV-CD and pRSV-PRT transfected cell lines were treated with 5-FC at the dosages of 0, 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 mM for 1, 3, 6, 8, 10, 13 and 15 days. Results: pRSV-PRT/PANC-1 cell line growth was significantly inhibited at 0.5 mM 5-FC just after 6 treatment days ($F=18.3$; $p<0.001$). The verctor pRSV-CD conferred to PANC-1 cells a lesser sensitivity to 5-FC, which inhibited cell growth only after 8 treatment days at dosage of 5 mM ($F=33.4$; $p<0.001$). MIA PaCa 2 cells transfected with both vectors become sensitive to 5-FC treatment at 5 mM after 13 days ($F=5.2$;$p<0.05$). 5-FC at any dosage and for any time of treatment was uneffective on transduced CAPAN-1 cell growth. Conclusions: the suicide gene CD seems useful to confer 5-FC sensitivity to some pancreatic cancer cell lines. The co-transfection of CD and 5PRT enhances 5-FC sensitivity, possibly because the enzyme encoded by 5PRT may in part counteract the 5-FU degradation observable in some pancreatic cancer cells.

065

DETERMINATION OF TOTAL PLASMA HOMOCYSTEINE: COMPARISON OF A NEW ENZYMIC ASSAY AND A HPLC METHOD

*Fermo I.; Mazzola G.; Sanpietro F.; D'Angelo A

*Lab. of Chromatographic & Separative Techniques and * Coagulation Service & Thrombosis Research Unit, IRCCS H San Raffaele, Milan, Italy.

Over the last two decades a number of studies have shown that moderate and persistent hyperhomocysteinemia is implicated in the development of atherosclerosis and thrombosis (1). Several methods have been developed for measuring total plasma homocysteine (tHcy), most of them based on HPLC analysis and fluorescence detection. Very recently, a totally automated enzymic assay for tHcy determination (Carolina, Liquid Chemistries Corp, CA, USA), performed on a biochemical analyzer capable of dispensing three reagents and of measuring absorbance at 340 nm, has been introduced.

Our aim was to compare the performance of this new procedure and an established home-made HPLC method based on SBD-F derivatization and the use of an internal standard. Since in our Institute tHcy levels are also routinely determined after the methionine loading test, we performed this study in the range: 4.0-60.0 µmol/L. Sodium citrate plasma samples were taken from 96 fasting donors (55 women and 45 men; age: 49 ± 18.7 yr, mean±SD) and frozen at -80°C until assay. The enzymic assay test is based, after reduction to free HCY, on the following biochemical reactions, catalyzed by CBS, CBL and LD enzymes, respectively.

1) serine+Hcy → L-cystathionine;
2) L-cystathionine → hcy+pyruvate+NH3
3) pyruvate+NADH → lactate+NAD

The chromatographic procedure included reduction of disulfide bonds by $NaBH_4$, use of cysteamine as internal standard, derivatization with ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-diazole-4-sulphonate (SBD-F), and fluorescence detection after separation by reversed-phase HPLC

Medians and ranges of tHcy plasma levels (n=96) observed were: 16.1 (3.9-61.8) and 17.5 (4.9-58.3) µmol/L for HPLC and enzymic kit, respectively. Linear regression analysis yielded: enzymic assay = 1.044 (± 0.546) + 1.011(± 0.024)HPLC (±SE), r = 0.975, Sx/y = 2.85 (p<0.001). The within- and between-run reproducibilities of two plasma samples (tHcy levels: 9.9 and 51.6 µmol/L) were: HPLC: 2.0% and 3.8% and, 4.0% and 4.7%, respectively; New assay: 2.3% and 1.4% and, 4.1% and 3.7%, respectivly.

To conclude the enzymic assay is an appropriate method to determine plasma tHcy both for clinical routine and research application, considering its semplicity of execution not requiring a skilled technical staff.

1. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. Blood 1997; 90:1-11.

066

PFA-100™ E BIOPSIA RENALE PERCUTANEA ECOGUIDATA DOPO DDAVP

*Bonifati C., *Manno C., °Ranieri P., °Sardone V., °Micelli M., * Schena F.P.

*Istituto di Nefrologia, Università degli Studi-Bari °Laboratorio di Coagulazione, Azienda Policlinico-Bari

PREMESSA: La biopsia renale percutanea ecoguidata è una procedura diagnostica ragionevolmente sicura, sebbene le complicanze emorragiche post-bioptiche siano frequenti. Nel seguente studio abbiamo valutato l'efficacia della DDAVP (1-deamino-8-D-arginina vasopressina) sull'incidenza di complicanze e la validità del tempo chiusura in vitro (CT) (sistema PFA-100™, Dade-Behring,Germany) per lo studio dell'emostasi primaria nei pazienti da sottoporre a biopsia renale. MATERIALI E METODI: Lo studio randomizzato controllato in doppio cieco è stato eseguito su 36 pazienti, con funzione renale e parametri coagulativi nella norma. Al gruppo sperimentale (B) sono stati somministrati, un'ora prima della biopsia renale, 0,3 mcg/kg di DDAVP s.c., versus placebo nel gruppo controllo (A). Oltre ai test di screening coagulativi e al tempo di emorragia (TE) secondo IVY, prima e dopo somministrazione di DDAVP/placebo sono stati effettuati: controlli ecografici, CT con collagene/adrenalina (CEPI-CT) e collagene/adenosina 5'-difosfato (CADP-CT)], FVIII attività (FVIII:C), fattore vonWillebrand Ag (vWF:Ag), fattore correlato alla Ristocetina (vWF:RCo).
RISULTATI: I due gruppi non si differenziavano per le caratteristiche basali. Si è evidenziata una riduzione significativa (p<0,04) di complicanze emorragiche nel gruppo B (4/18; 22%) rispetto al gruppo A (10/18; 55%). Nei pazienti che hanno presentato un ematoma, inoltre, le dimensioni erano inferiori (p=0,02) nel gruppo B: 83,0±173,7 vs. 254,7±257,7. Differenze statisticamente significative dei test coagulativi sono state riscontrate solo nel gruppo B (vedi tabella):

	pre-DDAVP	post-DDAVP	p
CEPI-CT (sec)	137,6 ± 33,7	102,3 ± 34	0,008
CADP-CT (sec)	80,9 ± 12,0	64,4 ± 21	0,003
APTT (ratio)	1,08 ± 0,1	0,95 ± 0,1	0,0003
F VIII:C (IU/dl)	94,1 ± 34,5	196,0 ± 111	0,002
vWF:Ag (IU/dl)	114,2 ± 28,6	170,3 ± 59	0,003
vWF:RCo (%)	111,7 ± 26,8	180,3 ± 68	0,002

In questo gruppo, inoltre, si è riscontrata una correlazione significativa inversa (p<0,001) tra CT e complesso FVIII/vWF. In 3/36 casi il TE>6 min non è stato confermato dai CEPI e CADP-CT eseguiti in vitro. CONCLUSIONI: Questo studio ha dimostrato che la somministrazione di DDAVP riduce le complicanze emorragiche post-bioptiche; l'efficacia del farmaco è stata comprovata dalla correlazione riscontrata con i CT in vitro. I nostri risultati suggeriscono, inoltre, che il tempo di chiusura in vitro (che non risente della soggettività dell'operatore come per il T.E. in vivo) e la sua sensibilità alle variazioni del complesso FVIII/vWF endogeno prodotte dalla vasopressina possono essere uno strumento utile nella valutazione prebioptica.

Bibliografia: Stiles K, et al. J Nephrol. 14 : 275-279, 2001.

067

STUDIO DELLE MODIFICAZIONI DELLE FUNZIONALITÀ PIASTRINICA, VALUTATA CON LO STRUMENTO PFA-100, IN PAZIENTI IN TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE CON COUMADIN.

Cascio A., Cillari E.

U. O. Complessa Patologia Clinica,Centro 248 della Federazione Centri Sorveglianza Anticoagulanti (FCSA), Azienda Ospedaliera "V. Cervello", Palermo

Utilizzando lo strumento PFA 100 (Dade- Behring, Liederbach, Germany) si sono studiate le eventuali disfunzioni della funzionalità piastrinica indotta dalla terapia anticoagulante orale (TAO) in 33 pazienti (26 studiati sia prima sia durante la TAO e 7 già in trattamento) afferenti al nostro Centro FCSA. In contemporanea è stato studiato come campione di controllo un gruppo di 31 donatori sani afferenti al Centro Di Medicina Trasfusionale.
Il campione di controllo aveva i seguenti tempi di formazione del tappo di fibrina:
in presenza di collagen/ADP : 51"-170" (70% tra 71"-118"); in presenza di collagen /EPI : 63"-249" (68% tra 85"-165").
Nel 70% dei pazienti in TAO i tempi di formazione del tappo di fibrina in presenza di collagen/ADP era nel range proprio dei controlli (tra 71" e 118"). Quelli che all'inizio presentavano valori inferiori a 71" (23%), tornavano nel range 71"-118" dopo breve tempo. L'analisi del tempo di formazione del tappo di fibrina in presenza di collagen/EPI dimostrava che esso era nel range in tutti i pazienti, tranne in 14 in cui era >di 165". Comunque la TAO migliorava i tempi di formazione del coagulo in 12 di essi, riportandoli nel range dei controlli sani. La TAO non modificava in maniera significativa la conta delle piastrine. In conclusione i dati nel loro insieme indicano che la TAO non ha effetti negativi sulla funzionalità piastrinica, anzi sembra esercitare un effetto positivo riportando i pazienti che tendono ad essere iperaggreganti verso il range normale e accorciando i tempi di formazione del coagulo, in presenza di collagen/EPI, in quei pazienti che presentano valori oltre i 165".
In conclusione il PFA 100 si rivela un utile strumento per valutare la funzione piastrinica, consentendo un efficace monitoraggio della emostasi primaria nei pazienti in TAO
Bibliografia. Cariappa R. et al Comparison of PFA-100 and bleeding time testing in pediatric patients with suspected hemorrhagic problems. J. Pediat. Hematol. Oncol 25; 474-479. 2003

068

PLASMA LEVELS OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INIBITOR TYPE 1, FACTOR VIII, PROTROMBIN FRAGMENT 1+2, ANTICARDIOLIPIN AND ANTIPROTHROMBIN ANTIBODIES REPRESENT RISK FACTORS FOR THROMBOSIS IN HEMODIALYTIC PATIENTS

De Lucia D. [2]; Molino D. [1,2,3]; Sessa M.[2]; De Francesco F. [2]; Misso M. [2]; Tagliaferri A. [2]; Marotta R. [1,2,4]; Anastasio P. [1]; Gaspare De Santo N. [1];

[1]Division of Nephrology, Second University of Naples, [2]Department of General Pathology, Clinical Pathology and Laboratory of Hemostasis and Thrombosis, [3]Ph.D program in Nephrological Sciences, [4]Ph.D. Program in Aerospace Medicine and Biology, Second University of Naples, Naples, Italy

Patients with end stage renal disease are prone to hemorrhagic complications and simultaneously they are at risk for a variety of thrombotic complications such as thrombosis of dialysis blood access, subclavian vein, coronary arteries, cerebral vessel and retinal veins, as well as priapism. We describe results of our studies to identify changes in hemostatic balance in patients on maintenance HD therapy that probably contributed to a hypercoagulable state.

The study was devised to 1. identify the marker of thrombophilia in hemodialyzed patients, 2. to establish a role for antiphospholipid antibodies in thrombosis of the vacsular access, 3.to characterize phospholipid antibodies in hemodialysis patients, 4. to study the effects of dialysis on coagulation cascade.

A group of 20 hemodialysis patients with no thrombotic complications (NTC) and 20 hemodialysis patients with thrombotic complications (TC) were studied along with 400 volunteer blood donors. Patients with SLE were excluded. Also patients with nephrotic syndrome were excluded. All patients underwent a screening Protrombin Time (PT), Activated Partial Tromboplastin Time (APTT), Fibrinogen (Fg), Coagulation factors of the intrinsic and extrinsic pathway, Antithrombin III (AT-III), Protein C (PC), Protein S (PS), resistance to Activated Protein C (APC-resistance), Prothrombin Activation Fragment 1+2 (F1+2), Plasminogen (PLG), Tissue type Plasminogen Activator (t-PA), Plasminogen tissue activator inibitor type-1 (PAI-1), Anti-cardiolipin antibodies type M and G (ACA-IgM and ACA-IgG), Lupus Anticoagulant Antibodies (LAC) and antiProThrombin antibodies type M and G (aPT-IgM and aPT-IgG).

The study showed that PAI-1, F 1+2, Factor VIII, ACA IgM and aPT-IgM were significantly elevated over controls both in TC and NTC however they could distinguish patients with thrombotic complications from those without, being maximally elevated in the former group. The novelty of the study is represented

068

by the significant aPT increase occurred in non-SLE hemodialysis patients and particularly in those with thrombotic events. In addition there was a reduction of Factor XII during the treatment It is possible to assume in the TC group at at a lesser extent olso in NTC that endothelial cells liberate PAI-1 in the vascular lumen which causes hypofibrinolysis. In addition an excess of Factor VIII is activated by endothelial dysfunction with subsequent activation of the coagulation cascade as demonstrated by elevated F 1+2 and Fibrinogen. ACA-IgM on turn are capable to interphere with the system of protein C, a potent anticoagulant factor which inactivates cofactors Va and VIIIa. They also induce the expression of procoagulant factors on the surface of the endothelial cells.

In conclusion the hypercoagulable state caused by alterations of coagulation and fibrinolytic factors is cause of vascular access dysfunction and thrombosis of various districts.

069

ASSESSMENT OF THE THROMBOPHILIC RISK IN WOMEN CANDIDATES TO HORMONE REPLACEMENT THERAPY

Consiglio P., De Michele S., Salvia M., Tusa G., Calabrò G., Aiosa A., Di Maio C., Faranna C., Ingrassia A., Maratta A., Trapani M.R., Vitale G., Amato G., Lombino F.,* Di Natale R., Menozzi I.

A.R.N.A.S Ospedale Civico, Palermo.
Laboratorio Analisi. *Divisione di Ginecologia.

Aim: to apply a score-based assessment tool of the thrombotic risk in women in menopause to be treated with hormone replacement therapy (HRT).
Hormone replacement therapy in menopause is associated with a significantly higher thrombotic risk, as reported in the current literature on the thromboembolism predisposing factors. In agreement with the gynaecologists of our hospital, we prepared an anamnestic-diagnostic questionnaire for the thromoboembolic risk assessment, to be admistered before performing specialistic laboratory tests. The features of the possibly HRT-treated women in menopause that we considered in our questionnaire are: thrombosis family and personal history, age, obesity, smoking habits, hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, malignancy, psychotropic drugs and obstetric pathology. We assigned a score ranging from 0 to 5 to each factor according to the risk level. The scale has been designed on case-control and cohort studies from the current literature. Therefore patients are splitted in two groups: low risk women with a total score ≤ 5 and average or high risk women with a total score > 5. Women with average or high risk will undergo neither HRT nor specialistic laboratory tests. Women with low risk will be screened for thrombophilia, including basic coagulative tests, physiological inhibitors, omocysteinemia, antiphospholipid antibodies and genetic mutations for Factor V, Factor II and MTHFR. A positive result in the thrombophilic study excludes the treatment with HRT. Only women with risk ≤ 5 are fit for the HRT. Both low risk groups, either using HRT or not, will have been monitoring for 2 years in a prospectic study to consider the possible appearance of thromboembolic events.
Conclusions: the use of this questionnaire allows a better selection of the patients for HRT and a reduction of the necessary specialistic tests. The recent introduction of the questionnaire does not permit to present a statistical analysis.

070

D-DIMERO: IMPORTANTE INDICATORE IN PROFILASSI ANTI-TVP DOPO CHIRURURGIA ORTOPEDICA MAGGIORE DEGLI ARTI INFERIORI.

Troglia G., Bosio K., Vinai E., Di Matteo F.

Casa di cura di riabilitazione intensiva "Stella del mattino" Fondazione Orizzonte Speranza – ONLUS, Boves, CN, Italia.

OBIETTIVI. I valori plasmatici di produzione e degradazione della fibrina (FbDP) o D-Dimero (DD) (valore normale: 64-494 ng/ml) sono elevati nel 97% dei pazienti (p) con TVP (trombosi venosa profonda.) e TEP (embolia polmonare); un valore normale esclude evento in atto (val. preditt. neg. 98%; sensibilità e specificità 95-100%)(1, 11), eliminando nel 30% dei casi tecniche diagnostiche più invasive e costose. Senza adeguata profilassi, l'incidenza della TVP è pari al 50% dopo Chirurgia ortopedica maggiore negli Arti inferiori., con DD maggiore da 4 a 20 volte il valore pre-chirurgico. (2-3), di difficile diagnosi per numerose forme asintomatiche (5). Anche con terapia si ha lisi del trombo solo in 20-30% dei p. Nel 40% dei p con TVP si ha TEP e mortalità dal 10 al 20 %. La soglia di normalità del test va corretta in funzione dell'età (4). La terapia anti-coagulante orale (TAO) è opportuna in corso di TVP e TEP per almeno 3-6 mesi (6). Il valore del DD ha fondamentale importanza per incrementare terapia a dosaggi adeguati (7), poiché anche l'Ecodoppler non rileva le trombosi distali (8). METODI. Dal 1/5/2000 al 1/2/2004 ai 1542 p ricoverati in riabilitazione intensiva post-Chir. Ortop. magg. AA.II. a 8-10 gg dall'intervento, sono stati eseguiti 1868 test del DD con metodo ELFA (VIDAS-DD, bio-Mérieux) su siero separato da sangue venoso in citrato trisodico 0,11 mol/l (9). RISULTATI. I p avevano DD con valori da 1200 a > 10000 ng/ml, nettamente oltre i v.n. corretti per età ($p<0,01$), nesso di causalità diretto con recente intervento chirurgico. I valori di DD sono suddivisibili nelle seguenti fasce: da valori di 1201 a 2500 (682 test); da 2501 a 4000 (598); da 4001 a 5000 (190); da 5001 a >10000 (188). Tutti i p erano in profilassi con Eparina calcica (dose corretta in base al peso corporeo, aPTT , +- ASA 100 mg) o Eparine bpm., per 3 sett; dopo dimissione è stato consigliato Defibrotide per 1 mese + ASA 100 mg per 2 mesi. Tuttavia con valori di DD> 4000, sintomi TVP, Score Wells > 3 (10) e fattori di rischio (obesità, DM, Varici, Iperomocisteina), dei 194 p a cui si è eseguito Ecodoppler venoso AA.II., solo in 19 p. è risultato positivo per TVP, indicando necessità di esecuzione solo quando il DD è > 6000, anche senza segni clinici (11). In 379 p con DD > 4000 si è instaurata TAO (Warfarin secondo INR tra 2 e 3), ottenendo decremento DD a v.n. in circa 3 mesi (12,13). Si è ripetuto dos. DD a 3 sett. in 275 p: 95 di essi hanno avuto un decremento significativo < 2500 ng/ml, permettendo così sospensione della TAO alla dimissione (ancora EBPM x 20 gg, quindi Defibritide e ASA). CONCLUSIONI: Il DD è il test più affidabile ed economico per impostare una corretta profilassi delle TVP dopo Chir. Ortop. magg. Arti inf. BIBLIOGR: 1) PERRIER A, Lancet, 1999, 353: 190-195. 2) LEVY G. Presse Méd. 1991; 20, 34, 1647-1650. 3) VILLE D. Réunion GEHT 6-7.4.1995, Poster. 4) LOWE G.D.O. Thromb.Haemost. 1997, 78(1), 47-52. 5) HAGER K, Gerontol., 1995; 41, 159-165. 6) FCSA-DETTORI A.G. Guida imp. anticoag. orali, n.1, 4/1991.7)TROGLIA G., Bioch. Clin, 2000 (24), 4, 283. 8) KEARON C. Ann Intern Med 1998, 128: 663-677. 10) De MOERLOOSE P. Thromb.Haemost., 2001, 85, 185-186. 11) WELLS PS. Lancet 1997; 350: 1795-1798. 12) SHIOTA N. J Orthop Sci 2002;7(4):444-50. 13) L.g. diagnosi, profil., terapia TVP, SISET, Haematologica, 88, 12/2003. 14) RAKE R.E., BOPE E.T. Conn's Current Therapy, Salerno, 2003; 207-213 e 325-333.

071

DETERMINATION OF HUMAN PLASMA PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE (VITAMIN B6): EVALUATION OF THREE DIFFERENT METHODS.

*Fermo I.; Mazzola G.; Sanpietro F.; D'Angelo A.

*Lab. of Chromatographic & Separative Techniques; Coagulation Service & Thrombosis Research Unit; IRCCS H San Raffaele, Milano, Italy.

Vitamin B6, measured as pyridoxal 5-phosphate (PLP), is a co-enzyme in the transsulfuration pathway of homocysteine metabolism. Since depletion of PLP has been suggested as an independent risk factor for cardiovascular disease, PLP is frequently measured to guide patient care. Moreover vitamin B6 is significantly diminished in siderobalstic cell anemia, in diabetic neurophaty, in renal insufficiency and, deficiency of PLP has also been associated with immunological changes observed in patients infected with HIV.

Not a large number of procedures have been developed for direct measurement of PLP because of the difficulties with standardization and defining the normal reference range. Therefore few comparative data, concerning the ability of methods to determine the vitamin, was available. In this study we compare three assay: A) "Immunodiagnostic" kit which was performed in HPLC; B) a home-made radioenzymatic assay (REA) based on the selective extraction of liberated [3H]tyramine and its subsequent quantification by liquid scintillation counting after the decarboxylation of high-specific-activity [3H]tyrosine by tyrosine apodecarboxylase enzyme. (1); C) "Buhlmann" vitamin B6 REA kit which avoid deproteinization step.

The study was performed on sodium citrate plasma sample of 80 donors (age range: 30-60 yr) including healthy subjects and patients under PLP supplementation. Linear regression analysis gave: Buhlmann= -2.96 + (1.291*HPLC), r= 0.917; home-made= -5.288 + (0.925*HPLC), r=0.978; Buhlmann = -18.9 + (1.073*home-made), r=0.912. .

Medians and ranges found were: 29.6 (2.0-380), 36.9 (4.4-448.0) and 34.4 (4.1-415.4) nmol/L, for home-made, Buhlmann and HPLC procedures, respectively.

Plasma sample with PLP level of 33.5 nmol/L was used for evaluate the reproducibility:

assay	Detection Limit (nmol/L)	CV% intra-assay	inter-assay
home-made	3.0	9.6	9.5
Buhlmann	2.6	4.6	4.8
HPLC	1.5	5.7	6.5

In spite of the results were comparable, HPLC and Buhlmann methods, thanks to the minor variability, were found to be more suitable for routine measurement of plasma PLP.

1) Camp VM, Chipponi J, Bahjat A. Clin Chem 29/4 (1983) 642-44.

072

HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND RETINAL VEIN THROMBOSIS

De Stasio G.1; Barillari G. 2; Roman D. 2;Giacomello R. 1;Dello Russo P.2;Biffoni F. 2;Bandello F. 3; Gonano F. 1;

1Department of Experimental and Clinical Pathology and Medicine, University of Udine, Italy
2Hemophilia and Thrombophilia Center, Department of Immunohematology and Transfusion Medicine, General Hospital, Udine, Italy
3Department of Ophthalmology, University of Udine, Italy

Elevated plasma homocysteine is an independent risk factor for thrombosis and vascular disease. Venous thromboembolism affects approximatively 1 per 1000 persons per year. However, little is known about the real incidence of retinal vein thrombosis. Furthermore, the real role of hemostasis-related genetic and/or acquired risk factors (such as antiphospholipid antibodies, natural coagulation inhibitors, polymorphisms in Factor V, Factor II and MTHFR, fasting homocysteinemia), has not been accurately stated yet.

In this observational prospective study 30 consecutive patients with central or branch retinal vein occlusion (RVO) were examined to investigate the role of potential inherited and acquired thrombophilic risk factors. Patients with glaucoma, diabetes mellitus and uncontrolled hypertension were excluded.

Median age was 55 yrs (19-82) and male/female ratio about 1:1. Among all hemostatic parameters evaluated (Antithrombin, Protein C, Protein S, free Protein S, APC Resistance, G20210A Prothrombin mutation, Antiphospholipid Antibodies, TAFI, Homocysteinemia, C677T MTHFR polymorphism), only abnormal fasting Homocysteine levels resulted significantly associated with RVO. In fact, in 19/30 patients (accounting for a prevalence of 63%) HyperHomocysteinemia was documented (fasting Hcy > 15 μM), while homozigosity for C677T mutation of MTHFR gene was observed in 5/30 cases (prevalence of 17%, not statistically significant as compared to normal population) and Anti-β2 GP-1 Ab of IgM class were positive in 2/30 patients (at a low titer and in presence of normal Anti CLP Ab, being thus unsignificant). All other investigated hemostatic risk-factors resulted normal or absent.

In our series, fasting Hyperhomocysteinemia resulted strongly associated with Retinal Vein Occlusion. Further investigations are now necessary to determine the origin (congenital or acquired) of Hyperhomocysteinemia. Moreover, an L-Metionine loading test will allow a more accurate evaluation of the true prevalence of HyperHomocysteinemia in the pathogenesis of Retinal Vein Occlusion.

073

VEQ PER BIOCHIMICA CLINICA SU SIERO - ENZIMI: VARIABILITÀ ANALITICA INTERLABORATORIO, VARIABILITÀ E BIAS INTERMETODO.

Secchiero S., Zardo L., Sciacovelli L., Plebani M.

Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Il Programma di VEQ per Biochimica Clinica su siero gestito sin dal 1985 dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB), dal 2003 prevede una collaborazione con il Gruppo Controllo Qualità Analitico (GCQA) dell'AO S. Orsola-Malpighi di Bologna per quanto riguarda la fornitura dei materiali di controllo (da parte del GCQA) e lo scambio dei risultati tra i due Centri. I materiali di controllo utilizzati dal ciclo 2003 sono costituiti da matrici naturali di origine umana a differenza di quelli liofili del commercio dei cicli precedenti.
In questo lavoro si è voluto focalizzare l'attenzione sui risultati relativi ai 10 enzimi inseriti nel pannello di 28 costituenti per studiare, oltre alla variabilità inter laboratorio per gruppo omogeneo, il comportamento dei vari metodi in termini di variabilità e bias intermetodo. L'elaborazione è stata effettuata su circa 500 risultati per AST, ALT, GGT, ALP, LDH, CK, CHE e Amilasi totale; su 260 per la Lipasi e 120 per l'Amilasi pancreatica.
L'analisi della variabilità analitica interlaboratorio, calcolata come media dei CV% per metodo omogeneo osservati sui 12 campioni del ciclo 2003, ha evidenziato i seguenti CV%: AST 7.9, ALT 11.3, GGT 7.5, ALP 9.3, LDH 5.3, CK 6.7, CHE 8.0 Amilasi totale 8.2, Amilasi pancreatica 9.6 e Lipasi 13.8.
Dall'analisi dei CV% dei singoli metodi, per alcuni enzimi si sono riscontrate delle notevoli differenze; per es. per GGT, il metodo che utilizza il substato p-nitroanilide non carbossilato presenta un CV del 16% in confronto ai CV del 4.5 e 5.8% dei metodi che utilizzano il substrato carbossilato; o per ALP, il metodo IFCC che utilizza il tampone AMP presenta un CV inferiore (6.3%) rispetto al metodo con AMP, non IFCC (CV = 11.5%) e al metodo con tampone DEA (CV = 11.0%).
Lo studio dei bias intermetodo ha evidenziato scostamenti attesi; per es. per l'ALP i rapporti medi (%) tra i valori ottenuti con tampone AMP e quelli ottenuti con tampone DEA sui materiali di controllo del 2003 sono risultati del 41% contro rapporti del 75%, 80% e 74% ottenuti con i materiali del commercio utilizzati nel 2000, 2001 e 2002, rispettivamente. Un altro es. è la Lipasi: mentre sui materiali di controllo utilizzati nel ciclo di VEQ 2002 la chimica secca forniva risultati di circa 21 volte superiori a quelli ottenuti con il metodo metilresorufina, nel 2003 il rapporto tra i due metodi è risultato mediamente di 4.3.
Concludendo: 1) la variabilità interlaboratorio si può considerare soddisfacente 2) i Programmi di VEQ possono fornire utili indicazioni sui metodi migliori e su quelli da abbandonare 3) l'utilizzo di materiali di controllo di origine umana risolve il problema della non commutabilità, spesso presente quando si utilizzano materiali a diversa matrice o con aggiunte di enzimi di origine animale, a diversa composizione isoenzimatica.

074

PROGRAMMA DI VEQ PER I MARCATORI BIOCHIMICI DI LESIONE MIOCARDICA: CRITERI DI ACCETTABILITA' DELLE PRESTAZIONI.

[1]Sciacovelli L.(1), Zaninotto M. (2), Pagani F. (3), Panteghini M. (3), Plebani M(1-2).

(1)Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV), (2)Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. Padova, (3)Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, A. O. 'Spedali Civili', Brescia.

La valutazione delle prestazioni analitiche dei laboratori è un aspetto importante e cruciale nella gestione dei Programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ). La formalizzazione di un giudizio in termini di eccellenza, accettabilità o non accettabilità permette al laboratorio di interpretare in modo chiaro ed inequivocabile la qualità dei propri risultati. Nell'ambito del Programma di VEQ per i Marcatori Biochimici di Lesione Miocardica gestito dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB), il giudizio della prestazione analitica (ottima, buona, accettabile, non accettabile) è valutato sulla base del confronto tra l'indice di scostamento (IS: differenza tra il risultato ottenuto dal laboratorio e il valore assegnato) e limiti fissi (errore totale ammissibile, Eta).
L'Eta per ogni analita inserito nello schema (troponina I, troponina T, CK-MB massa, mioglobina) è stato individuato sulla base delle raccomandazioni scientifiche e della valutazione dello stato dell'arte (metodologie disponibili in commercio, andamento delle prestazioni analitiche dei laboratori) facendo in modo che non più del 30% dei laboratori risultasse avere una prestazione non accettabile. Nei cicli 1999-2002, si è osservato un significativo miglioramento delle prestazioni analitiche dei laboratori: in particolare il numero delle prestazioni non accettabili (PNA) è diminuito dall'11,6% al 5,3% per la troponina I, e le prestazioni ottime sono migliorate dal 49% al 60% circa. Dati analoghi si sono osservati per gli altri marcatori biochimici: le PNA sono diminuite dal 19,5% all'11,6% per la mioglobina e dal 13,2% al 3,9% per la CK-MB. Al fine di incoraggiare i laboratori ad un miglioramento continuo della qualità delle proprie prestazioni e stressare i produttori dei sistemi diagnostici che mostrano un'insufficiente prestazione ad intraprendere le opportune azioni correttive, il CRB ha adottato per il ciclo 2003, valori di Eta più bassi.
La distribuzione delle prestazioni analitiche dei laboratori è risultata soddisfacente per tutti gli analiti e soddisfa il criterio definito dal CRB (PNA < 30%):

	TnI	TnT	CK-MB	Miogl.
Non Accett.	11,4	15,9	4,3	4,8
Accettabile	19,0	15,9	12,2	10,3
Buona	28,6	19,0	32,0	25,9
Ottima	41,0	49,2	51,5	59,0

- Clin Chim Acta 2001,309,2:183-99.

075

LA SODDISFAZIONE DEL CLIENTE INTERNO

Frezzotti A., Strusi P., Governatori D.,Tocchini M.

Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera "Umberto I" Ancona

Introduzione Accanto al processo primario di erogazione del prodotto/servizio, vi sono processi di supporto importanti per il funzionamento della organizzazione. I processi di supporto hanno come obiettivo primario la Soddisfazione del Cliente Interno, il cui grado di raggiungimento va valutato periodicamente.
Materiali e metodi Sono state condotte a distanza di circa due anni due indagini rivolte a tutti gli operatori del Laboratorio: la prima nel corso della certificazione secondo la ISO 9002/1994 e la seconda nel passaggio alla ISO 9001/2000. Quali componenti determinanti del livello di soddisfazione sono stati identificati i seguenti 4 "attributi" di valore della organizzazione: condizioni di lavoro, collaborazione, professionalità, sistema qualità. I questionari si articolavano in 13 domande. Nel primo questionario per ogni domanda la scala di valutazione era su 5 livelli e con valori numerici, nel secondo su 4 livelli con la definizione del grado di soddisfazione per ogni livello; il primo questionario comprendeva due domande aperte. E' stata condotta una rielaborazione statistica dei risultati calcolando il grado di soddisfazione per ogni singola domanda. E' stato effettuato un confronto, possibile per 11 domande, tra i risultati prodotti dal secondo questionario rispetto a quelli ottenuti dal primo. I punteggi medi ottenuti per ogni singola domanda sono stati rapportati a 100; sono stati considerati soddisfacenti punteggi superiori a 60/100 e punteggi il cui scarto rispetto al questionario precedente era inferiore a 10/100.
Risultati Il primo questionario è stato compilato dal 68,7% ed il secondo dal 44,9% degli operatori. Nel primo questionario il punteggio massimo è stato di 77,1, relativo alla domanda sull'importanza del Sistema Qualità nel determinare un servizio più efficiente, nel secondo 73,3 relativo alla domanda su quanto l'attività personale incide sull'attività complessiva del laboratorio; il punteggio minimo è stato di 56,9 nel primo questionario e di 54,8 nel secondo questionario sempre per la stessa domanda sul confort dell'ambiente di lavoro. Uno scarto di 11 e 11,4 è stato osservato rispettivamente per la domanda sulla conoscenza di politica, strategie e obiettivi del Laboratorio e per la domanda sull'importanza del Sistema Qualità nel determinare un servizio più efficiente.
Conclusioni Si osserva un diminuito grado di soddisfazione in generale riguardo a tutti gli attributi definiti; la scarsa adesione alla compilazione del questionario conferma che gli operatori nel tempo sono diventati meno partecipi dell'organizzazione. Le domande con i punteggi più bassi o gli scarti più elevati rispetto al precedente questionario individuano le aree di criticità nelle quali intraprendere azioni concrete di miglioramento. Risulta evidente che impegno della Direzione sarà di favorire la comunicazione, affinché procedure, strategie e obiettivi siano effettivamente interiorizzati e proporre il Sistema Qualità con modalità applicative tali da risultare più accettate e comprese.

076

LA VERA IMPRECISIONE ANALITICA È MEGLIO STIMATA DA UN CONTROLLO DI QUALITÀ AUTOMATICO PIUTTOSTO CHE MANUALE.

Marigo B., Galzignato O., Guadagnin M., Babetto E., Afshar H., Carraro P.

Laboratorio d'Urgenza, Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

L'imprecisione analitica viene abitualmente stimata mediante un programma di valutazione interna di qualità (QC). Tale procedura però risente di alcune variabili pre-analitiche, alcune delle quali condizionano solo il materiale di controllo e non i campioni in esame. Per questa ragione l'imprecisione degli strumenti viene generalmente sovrastimata, ma non si conoscono studi che abbiano accertato questo bias. MATERIALI e METODI: abbiamo considerato un emogasanalizzatore Bayer Rapidlab 405 dotato di un sistema automatico di campionamento del QC (Automatic QC) a 3 livelli e una procedura standard di controllo mediante fiale liquide tamponate a 3 livelli Bayer a campionamento manuale. Sono state confrontate le prestazioni analitiche determinate con i due sistemi. Il periodo di osservazione è stato di 2 mesi. RISULTATI: risultano migliori le prestazioni del controllo automatico per gli analiti pH, pCO2, pO2, Na, K, Ca. La differenza più significativa riguarda la pressione parziale di O2 dove il QC manuale presenta un CV di 2.1, 6.3, 21.2 % rispettivamente nei 3 livelli, mentre in quello automatico i CV sono di 1,0, 1,8, 3,1 %. I livelli attesi medi nei 3 livelli sono simili, pur trattandosi di materiali molto diversi nel confezionamento. Le determinazioni di Emoglobina totale, COHb, MetHb e HHb mostrano invece la medesima imprecisione. CONCLUSIONE: è da ritenersi che la manipolazione dei materiali di controllo dell'emogasanalisi sia una fonte di variabilità significativa, in particolare per la pO2. La riproducibilità degli analizzatori è invece migliore di quanto poteva essere supposto mediante il QC manuale.

077

VERIFICA DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER ANALITI COMUNI DI CHIMICA CLINICA

Alborino F.[1], Burighel A.[1], Dente B.[2], Cilento M.[2], Gion M.[3], Cocco G.[3], Roncoroni G.[4], Bossi G.[4], Suigo E.[5], Rosso R.[5], Manzato F.[6], Chiozzi M.[6], Mayr A.[7], Wierer B.[7], Zepponi E.[8], Ursicino N.[8], Mori M.[9], Borgiani L.[9], Schinella M.[10], Giordani E.[10], Ceriotti F.[11], Guerra E.[11], Ferrero C.A.[11], Bonvicini P.[12], Venturini R.[12], Plebani M.[12]

1 Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - Ospedale Civile, Dolo (VE)
2 U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Osp. S. Paolo, Napoli
3 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Venezia
4 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese
5 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano" – stabilimento di Magenta
6 Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale C. Poma, Mantova
7 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Brunico (BZ)
8 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rieti
9 Laboratorio Analisi, E.O. Ospedali Galliera , Genova
10 Laboratorio Analisi, di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine , Rovereto (TN)
11 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano
12 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Per questo progetto è stato costituito un Gruppo di Studio a cui hanno aderito 12 centri.
Scopo del presente poster è quello di illustrare gli obiettivi del progetto ed il disegno sperimentale messo in atto per realizzarlo.
I quesiti fondamentali alla base del lavoro sono i seguenti:

1. Gli intervalli di riferimento (IR) oggi in uso sono corretti?
2. È possibile ipotizzare un IR uguale per tutti, almeno per i componenti che hanno un livello di standardizzazione elevata?
3. Esistono bias interlaboratorio tali da giustificare IR laboratorio dipendenti? e quindi i diversi IR oggi in uso nei vari laboratori sono giustificati?
4. Esistono differenze di popolazioni tali da giustificare IR differenti per aree geografiche?

Per rispondere a queste domande è stato impostato un esperimento collaborativo organizzato in 2 fasi.

Fase 1. Verifica analitica.

Scopo: confrontare i livelli di precisione dei laboratori partecipanti e la presenza di bias sia tra loro che nei confronti di materiali di riferimento. Al fine di mettere in evidenza eventuali comportamenti non commutabili dei materiali sono stati scelti materiali di origine e

Analiti: scelti in base ai seguenti criteri: a) disponibilità di materiale di riferimento, b) livello di standardizzazione del metodo analitico, c) disponibilità di metodi raccomandati internazionalmente. Per questi motivi sono stati eliminati dallo studio gli enzimi comuni, tranne la GGT. I costituenti previsti sono: acido urico, albumina, bilirubina totale, calcio, cloruro, colesterolo, creatinina, ferro, fosforo, GGT, glucosio, magnesio, potassio, proteine totali, sodio, trigliceridi, urea.

Materiali di riferimento a titolo noto: NIST livello 1 e 2; due sieri del programma di VEQ Prolarit; IRMM 452. Due pool di sieri congelati, preparati a cura del gruppo di Milano, a cui sono assegnati valori di riferimento per alcuni analiti (colesterolo, Na, K, glucosio). A questi materiali, utilizzati per verificare la presenza di bias, si aggiungono 2 altri materiali usati come controllo interno: BioRad Lyphochek a 2 livelli ed un pool di sieri congelato preparato da ciascun centro. Schema operativo: analisi in duplicato di ciascun materiale in 3 serie analitiche differenti.

Fase 2. Raccolta dati dagli individui di riferimento.

Ogni giorno, per un massimo di 25 giorni lavorativi anche non consecutivi, raccogliere ed analizzare campioni di circa 20 individui "sani" (in base a criteri anamnestici e biochimici) assieme ai materiali di controllo.

078

DETERMINAZIONE DEL BIAS (INTER-LABORATORIO E VERSO MATERIALI A TITOLO NOTI) PER ANALITI DI CHIMICA CLINICA (1)

Alborino F.; Burighel A.; Dente B.; Romano V.; Gion M.; Cocco G.; Roncoroni G.; Bossi G.; Suigo E.; Rosso R.; Manzato F.; Chiozzi M.; Mayr A.; Wierer B.; Zepponi E.; Ursicino N.; Mori M.; Borgiani L.; Schinella M.; Giordani E.; Ceriotti F.; Guerra E.; Ferrero C.A.; Bonvicini P.; Venturini R.; Plebani M.;

1 Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - Ospedale Civile Dolo (VE)
2 U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Osp. S. Paolo, Napoli
3 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Venezia
4 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese
5 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano" – stabilimento di Magenta
6 Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale C. Poma, Mantova
7 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Brunico (BZ)
8 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rieti
9 Laboratorio Analisi, E.O. Ospedali Galliera , Genova
10 Laboratorio Analisi, di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine , Rovereto (TN)
11 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano
12 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Nell'ambito di un progetto più ampio che ha come obiettivo la verifica degli intervalli di riferimento sono state valutate le prestazioni analitiche di 12 laboratori, sia in termini di errore casuale, sia di bias rispetto a materiali di riferimento a titolo noto. In questo abstract si presentano i risultati relativi a glucosio, acido urico, proteine totali, albumina, urea e creatinina.
Materiali e metodi. Vedi anche Abstract "Verifica degli intervalli di riferimento per analiti comuni di chimica clinica". Sistemi analitici: 10 sistemi Olympus e 2 sistemi Roche con reattivi dedicati.
Risultati. Dopo l'eliminazione degli eventuali dati aberranti sono stati calcolate la precisione complessiva di ciascun laboratorio, la variabilità interlaboratorio, il bias della media generale dal valore atteso ed il bias di ciascun centro sia dalla media generale che dal valore atteso. Come parametri riassuntivi presentiamo qui, per ciascuno dei 6 analiti il valore del bias medio dal valore atteso.

Centro	Glu.	Ac. Uric.	Prot. T.	Alb.	Creat.	Urea
1	-9,2%	-6,0%	-8,8%	-11,0%	11,9 %	-10,2%
2	-1,6%	-3,0%	-1,8%	-4,0%	15,6 %	-3,2%
3	-2,8%	-0,4%	-2,9%	-4,8%	8,7%	-0,1%
4	-2,9%	1,7%	1,0%	1,0%	17,1 %	1,2%
5	3,5%	-1,5%	1,3%	-3,1%	7,7%	-1,4%
6	-4,4%	-3,9%	-1,7%	5,8%	10,8 %	0,8%
7	2,2%	-2,1%	2,3%	-4,9%	12,3 %	-3,4%
8	1,0%	-0,6%	-0,4%	0,5%	35,7 %	1,9%
9	-1,1%	-3,0%	-2,2%	3,1%	-0,3%	-0,2%
10	-4,6%	-0,5%	3,7%	-4,9%	0,1%	-2,7%
11	-2,4%	3,4%	-2,9%	4,9%	15,2 %	-1,2%
12	3,1%	-0,9%	-0,1%	2,8%	6,7%	-0,4%

Conclusioni: rispetto ai materiali a titolo noto esistono bias anche di rilievo. Sarà essenziale capire se sono legati al disegno sperimentale o si riflettono anche sui risultati ottenuti sui pazienti.

079

DETERMINAZIONE DEL BIAS (INTER-LABORATORIO E VERSO MATERIALI A TITOLO NOTI) PER ANALITI DI CHIMICA CLINICA (2)

Alborino F.[1], Burighel A.[1], Dente B.[2], Cilento M.[2], Gion M.[3], Cocco G.[3], Roncoroni G.[4], Bossi G.[4], Suigo E.[5], Rosso R.[5], Manzato F.[6], Chiozzi M.[6], Mayr A.[7], Wierer B.[7], Zepponi E.[8], Ursicino N.[8], Mori M.[9], Borgiani L.[9], Schinella M.[10], Giordani E.[10], Ceriotti F.[11], Guerra E.[11], Ferrero C.A.[11], Bonvicini P.[12], Venturini R.[12], Plebani M.[12]

1 Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - Ospedale Civile Dolo (VE)
2 U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Osp. S. Paolo, Napoli
3 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Venezia
4 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese
5 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano" – stabilimento di Magenta
6 Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale C. Poma, Mantova
7 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Brunico (BZ)
8 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rieti
9 Laboratorio Analisi, E.O. Ospedali Galliera , Genova
10 Laboratorio Analisi, di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine , Rovereto (TN)
11 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano
12 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Nel presente abstract sono riportati i risultati, ottenuti nella prima fase del Progetto Intervalli di Riferimento, relativi ad altri 6 analiti: sodio, potassio, cloro, calcio, fosforo e magnesio.
Materiali e metodi. Vedi anche Abstract "Verifica degli intervalli di riferimento per analiti comuni di chimica clinica". Sistemi analitici: 10 sistemi Olympus e 2 sistemi Roche con reattivi dedicati.
Risultati. Dopo l'eliminazione degli eventuali dati aberranti sono stati calcolate la precisione complessiva di ciascun laboratorio, la variabilità interlaboratorio, il bias della media generale dal valore atteso ed il bias di ciascun centro sia dalla media generale che dal valore atteso. Come parametri riassuntivi presentiamo qui, per ciascuno dei 6 analiti il valore del bias medio dal valore atteso.

Centro	Sodio	Potassio	Cloro	Calcio	Fosf.*	Mg
1	-1,1%	-1,7%	-4,0%	-2,4%	-8,0%	-5,7%
2	-0,2%	-1,8%	-4,6%	-0,9%	-6,8%	0,3%
3	-1,4%	-2,5%	-3,6%	**-7,9%**	-7,6%	0,1%
4	-1,4%	-2,4%	-7,4%	3,5%	-1,5%	0,1%
5	-0,2%	-0,4%	-5,1%	-1,6%	-7,4%	-0,3%
6	0,6%	-0,5%	-3,6%	-1,4%	-10,7%	0,0%
7	-1,0%	-1,8%	-4,3%	-2,8%	-7,0%	-1,3%
8	0,9%	0,6%	-5,9%	-2,3%	-7,0%	-2,0%
9	-1,0%	-0,4%	-3,8%	-5,4%	-9,3%	-1,1%
10	**-2,5%**	-1,0%	-3,8%	-3,3%	-6,8%	-3,6%
11	0,0%	-1,2%	-3,1%	-1,1%	-6,8%	3,8%
12	0,2%	0,8%	-3,1%	0,8%	5,3%	3,9%

(*) bias da media di consenso Prolarit.
Conclusioni: i bias dall'atteso (target NIST) sono in genere molto contenuti per Na, K e Mg. Più rilevanti, e quasi sempre negativi i bias per Ca, Fosforo e Cloro. Anche in questo caso sarà essenziale capire se questi bias sono legati al disegno sperimentale o si rifletteranno anche sui risultati ottenuti sui pazienti.

080

DETERMINAZIONE DEL BIAS (INTER-LABORATORIO E VERSO MATERIALI A TITOLO NOTI) PER ANALITI DI CHIMICA CLINICA (3)

Alborino F.[1], Burighel A.[1], Dente B.[2], Romano V.[2], Gion M.[3], Cocco G.[3], Roncoroni G.[4], Bossi G.[4], Suigo E.[5], Rosso R.[5], Manzato F.[6], Chiozzi M.[6], Mayr A.[7], Wierer B.[7], Zepponi E.[8], Ursicino N.[8], Mori M.[9], Borgiani L.[9], Schinella M.[10], Giordani E.[10], Ceriotti F.[11], Guerra E.[11], Ferrero C.A.[11], Bonvicini P.[12], Venturini R.[12], Plebani M.[12]

1 Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - Ospedale Civile Dolo (VE)
2 U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Osp. S. Paolo, Napoli
3 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Venezia
4 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese
5 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano" – stabilimento di Magenta
6 Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale C. Poma, Mantova
7 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Brunico (BZ)
8 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rieti
9 Laboratorio Analisi, E.O. Ospedali Galliera , Genova
10 Laboratorio Analisi, di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine , Rovereto (TN)
11 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano
12 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Nel presente abstract sono riportati i risultati, ottenuti nella prima fase del Progetto Intervalli di Riferimento, relativi agli ultimi 5 analiti del progetto: colesterolo, trigliceridi, bilirubina totale, ferro e GGT.
Materiali e metodi. Vedi anche Abstract "Verifica degli intervalli di riferimento per analiti comuni di chimica clinica". Sistemi analitici: 10 sistemi Olympus e 2 sistemi Roche con reattivi dedicati.
Risultati. Dopo l'eliminazione degli eventuali dati aberranti sono stati calcolate la precisione complessiva di ciascun laboratorio, la variabilità interlaboratorio, il bias della media generale dal valore atteso ed il bias di ciascun centro sia dalla media generale che dal valore atteso. Come parametri riassuntivi presentiamo qui, per ciascuno dei 5 analiti il valore del bias medio dal valore atteso.

Centro	Col(1).	Col(2)	TG	Bili.. T.	Ferro*	GGT#
1	-3,2%	3,7%	-5,4%	-7,4%	-5,2%	5,5%
2	-3,3%	3,7%	-3,0%	0,0%	-8,9%	-12,2%
3	-1,8%	4,6%	1,0%	4,2%	-6,1%	3,3%
4	-4,6%	-0,7%	3,7%	7,6%	-1,6%	-0,8%
5	-2,3%	4,2%	-5,1%	-0,5%	-2,9%	-10,5%
6	-2,4%	4,1%	-10,1%	10,2%	-6,5%	-18,6%
7	-2,1%	4,5%	-4,8%	-2,8%	-2,9%	1,8%
8	0,9%	5,9%	-1,0%	**-16,9%**	1,3%	-12,6%
9	-4,1%		-6,7%	-5,4%	-9,6%	-11,3%
10	-3,6%	2,1%	-11,0%	-4,0%	-4,0%	-1,7%
11	0,6%	6,6%	-1,6%	-0,3%	-0,8%	-8,3%
12	-1,0%	6,2%	-1,7%	-4,8%	-1,5%	-20,1%

(*) bias da media di consenso Prolarit, (#) da IRMM.
Conclusioni: I segni negativi sui bias di Col (1) e TG sono condizionati dai valori elevati di bilirubina del NIST 2. Col (2) indica il bias ottenuto su sieri congelati: evidentemente i sieri liofili non sono commutabili e non saranno quindi da utilizzare come riferimenti di accuratezza.

081

IL RIESAME DELLA DIREZIONE STRUMENTO PER LA GESTIONE DI UN SERVIZIO DI MEDICINA DI LABORATORIO

Cremaschi A.

Ufficio Qualità, Azienda Ospedaliera di Treviglio

Introduzione: Nei servizi di Medicina di Laboratorio è sempre più diffusa l'implementazione di un Sistema Qualità, sia come forma di accreditamento professionale (norme CPA, norme APL, norma ISO15189), sia come applicazione del percorso di Certificazione ISO 9001:2000. In ogni caso il Riesame della Direzione è lo strumento chiave per la gestione di tutte le attività in un'ottica di Sistema.
Discussione: La nostra Azienda è Certificata ISO 9001:2000. Il Riesame della Direzione viene condotto semestralmente, ed è stato perfezionato, migliorandone la documentazione, anche alla luce dello sviluppo del progetto in tutti i Laboratori dell'Azienda, per consentire un paradigma comune nella presentazione, fornendo possibilità di confronto. È stato quindi predisposto un modulo per la conduzione del Riesame in ogni Servizio di Medicina di Laboratorio, che contiene gli aspetti che la norma ISO 9001:2000 riporta al punto 5.6.2 come Elementi in ingresso per il Riesame, integrati con aspetti fondamentali nell'economia del Sistema Qualità aziendale. Per facilitare l'approfondimento degli argomenti, e porre attenzione su tutti gli aspetti contenuti nei requisiti della norma, si richiede al Direttore di Laboratorio di esprimere, anche con l'utilizzo dei una griglia di giudizio, la valutazione dell'applicazione del SGQ nel periodo in osservazione, considerando il rispetto delle procedure e l'utilizzo della modulistica; il livello di coinvolgimento del personale; il monitoraggio dei rapporti con gli utenti; lo sviluppo della documentazione del Sistema Gestione Qualità, inteso come numero di nuovi documenti, numero delle revisioni, e riesame della documentazione presente; stato degli audit interni, sia come numero, che come Non Conformità emesse ed Azioni Correttive avviate; reclami – encomi degli utenti; analisi delle NC e relativo Pareto; stato delle azioni correttive e preventive; le prestazioni dei processi, intese come monitoraggio delle attività in corso; formazione del personale sia sul Sistema Qualità, che su aspetti della professione, e gestione delle risorse umane, con il monitoraggio della pianificazione delle ferie; la frequenza dei riesami della Direzione con lo stato delle azioni a seguire dal precedente Riesame; lo stato degli indicatori; la valutazione dei costi della non qualità; l'impatto organizzativo; le modifiche che potrebbero avere effetti sul SGQ (obiettivi del semestre successivo). In tal modo la rassegna sugli argomenti del Sistema Qualità consente di organizzare sistematicamente le evidenze sulla gestione del Laboratorio, mettendo la Direzione del Servizio in grado di affrontare in maniera propositiva la discussione del budget, avvalendosi dell'analisi dei dati sull'andamento di tutte le attività del Sistema Laboratorio.

082

IPOTESI DI USO DEI DATI DI VEQ e CQI PER UNA STIMA DELLA VALIDITA' CLINICA DI RISULTATI E METODICHE DI LABORATORIO

Rapi S. , Poggesi M., Brogioni M., Messeri G.
Lab. Centrale Analisi (AOU-Careggi. Firenze)

INTRODUZIONE
La strategia di controllo di qualità dei laboratori si basa sull'uso delle informazioni derivanti dai cicli di Valutazione Esterna Qualità (VEQ) e dal Controllo Qualità Interno (CQi). La VEQ fornisce indicazioni sulla posizione del laboratorio rispetto ad un Valore Atteso (accuratezza rispetto a media di consenso) e sulla dispersione (cv, ds) dei dati dei laboratori partecipanti. Il CQi fornisce informazioni sull'imprecisione (cv) del singolo laboratorio. Resta da definire cosa vuol dire tenere 'sotto controllo' precisione ed accuratezza. I dati forniti da un laboratorio di Chimica Clinica debbono avere un uso clinico, i parametri di variabilità e di accettabilità dei risultati dovranno quindi essere associabili a variazioni clinicamente significative. Gli studi sui valori omeostatici hanno permesso di individuare degli intervalli di variabilità biologica (cvb)1) che possono essere considerati come l'insieme di valori 'indistinguibili' da un punto di vista biologico. Un intervallo così definito può essere utilizzato in molti modi diversi per valutare la qualità e l'efficienza delle risposte.
MATERIALI E METODI
Nel presente studio è stata ricostruita la dispersione, attorno alla media di consenso della VEQ rispetto al cvb ed i dati ottenuti dal nostro laboratorio sono stati valutati rispetto a quest'intervallo di valori 'clinicamente indistinguibili'. Una prima valutazione è stata fatta considerando la posizione del valore sperimentale ottenuto per la VEQ ed una seconda studiando la dispersione dei dati in funzione del cvs ottenuto dal CQi. Dal confronto tra queste due curve possiamo ottenere una stima della significatività statistica delle risposte rispetto all'insieme dei valori indistinguibili. Utilizzando una logica di questo tipo sono stati seguiti nell'intervallo, ottobre 2003 gennaio 2004 (4 cicli VEQ) alcuni dei principali analiti di Chimica Clinica (Glu, Urea, Cre, Na, K, GPT, GOT, CK, LDH) studiando la percentuale di risposte 'clinicamente accettabili' secondo il criterio configurato.
RISULTATI
Per UREA; GLU; CK; GPT; GOT; LDH; non si evidenzia nessuna differenza di informazione (Veq entro 2ds; CVs inferiore traguardo analitico, 100% risposte accettabili). Per Cre, gennaio (VEQ – 1.97ds; CVs =Cvb=2.2), 20% valori non soddisfano requisiti clinici. Per K, ottobre (VEQ – 1.41ds CVs<Cvb=1.25), 48% valori non soddisfano requisiti clinici. Na VEQ entro le 2 ds. cvs > cvb , una % variabile (5-90 %) dei dati soddisfa i requisiti richiesti (variabilità legata inesattezza rispetto alla VEQ).

DISCUSSIONE
Per la maggior parte degli analiti la strategia ipotizzata non introduce cambiamenti sostanziali ma, riesce ad evidenziare come alcune metodiche risultino inadeguate per soddisfare i requisiti clinici, mentre altre ci consentano di lavorare in assoluta tranquillità. Appare interessante invece l'analisi dei dati relativi alla Cre (gennaio) e del K (ottobre). Il ciclo di Veq indica una posizione accettabile ed il cvs risulta inferiore al cvb (nostro traguardo analitico imprecisione) una % significativa dei dati non soddisfa i requisiti clinici. Configurando un sistema automatico che ricostruisca on Line le curve di dispersione dei valori accettabili (VEQ on Line) e dei valori sperimentali (CQi on line) si potrà ottenere giornalmente una stima realistica della reale validità clinica dei dati forniti. Potrebbe rivelarsi interessante incrociare l'informazione ottenuta con questo metodo con i dati clinici di soddisfazione e di utilizzabilità dei singoli analiti.
1) Performance-Driven Qualità Control Z.C. Brooks AACC Press

083

LE INTERFERENZE PREANALITICHE IN UN SISTEMA DI LAB AUTOMATION.

Specchia I., Di Serio F., Gassi P., Marsico S., Massaro A., Mastrolonardo P., Palumbo C., Pansini N.

Patologia Clinica I, Policlinico Bari, Bari

Scopo: nel nostro studio abbiamo valutato l'accuratezza del metodo HIL (Haemolysis, Icterus, Lipemia) per la determinazione dell'emolisi, bilirubina e torbidità in campioni biologici, sviluppato su Dimension® RxL Max™ (Dade Behering) ed applicato sulla Stream-Lab analytical Workcell. **Materiali e metodi:** 20, μL di siero dei campioni in analisi, sono dispensati in cuvetta e la misura dell'assorbanza a 405, 452 e 700 nm è convertita in un Index di HIL corrispondente ad un range di concentrazione (mg/dl) (Tab. 1).

Index	"H" Hemogl.	"I" Bilirub.	"L" Lip.
1	H ≤ 25	I ≤2	L≤25
2	25< H ≤50	2< I ≤5	25< L ≤50
3	50< H ≤200	5< I ≤20	50< L ≤200
4	200< H ≤300	20< I ≤40	200< L ≤600
5	300< H ≤500	40< I ≤60	600< L ≤1000
6	500< H ≤1000	60< I ≤80	1000<L ≤ 3000

N. 376 campioni erano analizzati sul Dimension® e l'Index "H" confrontato con il dosaggio dell'Hb eseguito su Sysmex SE 9000 Dasit (n. 172 campioni), l'Index "I" (n. 138 campioni) ed "L" (n. 65 campioni) con il dosaggio della bilirubina totale e dei trigliceridi rispettivamente. N. 20 campioni erano testati prima e dopo emolisi provocata dal congelamento, 37 campioni con iperbilirubinemia prima e dopo diluizione, 20 campioni con ipertrigliceridemia prima e dopo trattamento con Lipoclear®. **Risultati:** concordanza tra Index "H" ed Hb misurata: H2=100%, H3=90%, H4=80% H5=90%, H6=100%; tra Index "I" e bilirubina misurata: I2=76%, I3=96%,I4=90%, I5 e I6=100%; tra Index "L" ed i trigliceridi: < 30% ad ogni livello di HIL. I campioni emolizzati (Hb mediana = 800 mg/dl) ed i campioni itterici (Bilirubina mediana = 21.77 mg/dl) sottoposti a diluizione mostravano rispetto ai campioni non trattati, un significativo incremento nelle concentrazioni del NA, K, CPK, LDH, AST, ALT e Creatinina (Wilcoxon test: $p<0.0001$), non significativo per Glucosio, Bun. Nei campioni torbidi (Trigliceridi mediana = 668 mg/dl), il trattamento con il Lipoclear provocava, un significativo decremento nelle concentrazioni del NA, K, Bun, Glucosio e Creatinina. gli Index HIL relativi a concentrazioni di Hb e bilirubina causa di interferenza erano impostati per ogni singolo analista: in caso di interferenza il flag "Interferenza HIL" era trasmesso al LIS. **Conclusioni**: seppure da migliorare, il metodo HIL ha permesso, una migliore standardizzazione della qualità del campione nella fase preanalitica. **Bibliografia**: Grafmeyer D. et al. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automated analyzers. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33 :31-52.

084

VEQ PER BIOCHIMICA CLINICA SU URINA: STIMA DELLA VARIABILITÀ ANALITICA INTER-LABORATORI E DEGLI ERRORI DI REFERTAZIONE

Secchiero S., Zardo L., Sciacovelli L., Plebani M.

Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Il Programma di VEQ per Biochimica Clinica su urina gestito sin dal 1998 dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB) è l'unico sul panorama nazionale (con 125 Partecipanti) e dal 2003 prevede una collaborazione con il Programma di VEQ Inglese NEQAS. I risultati dei partecipanti afferenti al CRB, inviati sottoforma di referto in uso nel laboratorio con l'indicazione dei rispettivi intervalli di riferimento (IR), vengono rielaborati in modo da fornire un rapporto periodico che riporta la valutazione di ogni singola prestazione analitica ed una valutazione complessiva del laboratorio che tiene conto anche degli eventuali errori riscontrati nel referto. L'elaborazione statistica dei 22 analiti presenti nel pannello viene effettuata su circa 450 risultati per Na, K, Ca, P, urea, creatinina e urato, 280 per Cl, Mg, glucosio, amilasi e microalbumina, 200 per Proteine Totali, 80 per 5-HIAA, 65 per epinefrina, norepinefrina, dopamina e cortisolo, 25 per Cu, metanefrina, normetanefina e VMA.
L'analisi della variabilità analitica interlaboratorio, calcolata come media dei CV% per metodo omogeneo osservati sugli 8 campioni a diversa concentrazione del ciclo 2003, ha evidenziato i seguenti CV%: Na 3.4, K 3.4, Cl 3.7, Cu 25.8, Ca 5.1, P 4.7, Mg 5.8, glucosio 5.7, urea 4.9, creatinina 5.6, urato 7.2, amilasi 12.9, proteine t. 13.9, microalbumina 6.9, epinefrina 12.1, norepinefrina 10.2, dopamina 9.9, metanefrina 15.7, normetanefrina 15.3, 5-HIAA 11.9, VMA 14.1 e cortisolo 16.5.
Alcuni sistemi diagnostici hanno presentato, in tutto il range di concentrazione studiato, valori mediani con scostamenti significativi dalla mediana del metodo di appartenenza, per es. il sistema Beckman, nell'ambito del metodo uricasi, POD, PAP per il dosaggio dell'urato, presenta mediamente un bias del 12% (range 7-18%)
L'analisi dei referti dei 125 partecipanti afferenti al CRB ha rilevato molti errori di tipo non analitico: i laboratori, in una percentuale compresa tra il 16% del 1° esercizio e l'8% del 4° esercizio hanno effettuato almeno un errore. Nell'intero ciclo di VEQ abbiamo riscontrato 139 errori dovuti a: posizionamento della virgola (89), unità di misura (7), IR (13), inversione tra campioni (4), inversione del risultato di due costituenti nel referto (11), nomenclatura scorretta, es. urea/azoto ureico (5), identificazione del campione (4), fattore di convesione tra unità tradizionali e unità SI (4), calcolo del risultato (2).
Concludendo, se da una parte lo stato dell'arte (CV) nelle determinazioni urinarie si può considerare soddisfacente per la maggior parte dei costituenti (fa eccezione il rame), dall'altra si riscontrano ancora troppi errori nella fase post-analitica. Il nostro programma di VEQ può fornire uno stimolo continuo alla ricerca e correzione delle possibili cause di errore, anche di tipo non analitico.

Biochimica Clinica 1999;23,1:16-9.

085

REQUISITI ANALITICI NELLA DETERMINAZIONE DEI FARMACI

Bonvicini P[1], Pavòn MA[2], Padrini R[3] , Plebani M[1]

[1]Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova, Italy
[2] Práctica Profesional. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Hospital JM Cullen. SANTA FE. Argentina
[3] Servizio di Farmacologia Clinica, Azienda Ospedaliera, Padova, Italy

Esistono pochi riferimenti sui requisiti analitici necessari per l'analisi dei farmaci. Uno dei primi lavori (Glick) sosteneva che l'imprecisione analitica doveva essere inferiore a un quinto dell'ampiezza dell'intervallo terapeutico per monitorare la concentrazione del farmaco vicina al limite terapeutico, oppure inferiore al 60% dell'intervallo per verificare solamente se la concentrazione del farmaco è entro l'intervallo terapeutico. Successivamente è stato proposto di calcolare i requisiti sulla base dell'intervallo di variazione della concentrazione nel corso della terapia.
Il modello proposto in questo lavoro trae spunto dalla ipotesi di Glick e mira essenzialmente a minimizzare il rischio di considerare terapeutici valori che in realtà sono esterni all'intervallo stesso.
Su questa base la variabilità analitica deve essere tale che, con una probabilità del 95%
1. un valore "elevato" non possa risultare inferiore al 80° percentile dell'intervallo terapeutico
2. un valore "basso" non possa risultare superiore al 20° percentile dell'intervallo terapeutico
3. un valore "tossico" non possa risultare entro l'intervallo terapeutico

Per raggiungere i primi due requisiti è necessario che l'errore totale analitico (ETA) sia inferiore o eguale a 0.2 volte l'ampiezza dell'intervallo terapeutico).
Cioè ETA $\leq$ 0.2 (C_{max}-C_{min}), ove C_{max} e C_{min} sono rispettivamente il limite superiore e inferiore dell'intervallo terapeutico.
Analogamente, per il requisito 3 è necessario che l'errore totale analitico (ETA) sia inferiore o eguale a 0.2 volte l'ampiezza dell'intervallo tra il limite superiore terapeutico e la concentrazione tossica.
Cioè ETA $\leq$ 0.2 (C_{tox}-C_{max}) ove C_{tox} rappresenta la minima concentrazione tossica.
Sulla base dei valori di Cmin, Cmax e Ctox, sono stati calcolati i requisiti di imprecisione accettabili per l'ambito terapeutico (CVter) e e per l'intervallo tra la concentrazione massima e quella tossica (CVtox) per alcuni farmaci (Amikacina, Carbamazepina, Digossina, Fenitoina, Fenobarbital, Lidocaina, Litio, Teofillina). L'imprecisione accettabile per l'ambito terapeutico è superiore al 5.0 %, tranne per la teofillina per la quale il CV accettabile è 3.3 %. Considerando la concentrazione soglia per la tossicità, l'imprecisione accettabile è minore e al di sotto del 3.0 % tranne che per la fenitoina e la carbamazepina.

Glick JK. Expression of random analytical error as a percentage of the range of clinical interest. Clin Chem 1976; 22: 475-83.

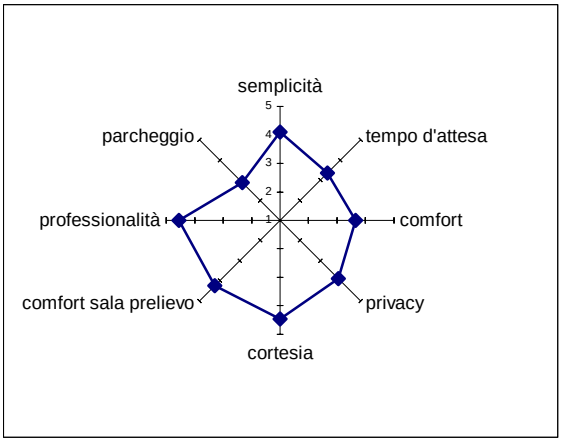
086

DALL'ASCOLTO DELL'UTENTE L'IMPEGNO AL MIGLIORAMENTO

Anesi A., *Esposito P., Pavesi F., Fontanella C., Fornaroli A., Montani A.

Dipartimento di Patologia Clinica, *Ufficio Qualità, A.O. della Provincia di Lodi, Lodi

Sono stati somministrati nel 2003 1500 questionari di gradimento per l'accessibilità ambulatoriale, nella versione "consigliata" (DGR VII/8504 del 22/03/02, sub allegato 1: Regione Lombardia) per valutare il livello di soddisfazione degli utenti dei laboratori analisi (Lodi, S. Angelo Lodigiano, Codogno e Casalpusterlengo) con una restituzione di 777 questionari validi (51,8%). Il questionario è strutturato in 12 drivers (+ 1 aggiunto da noi) e 29 items (+ 5 aggiunti). Modalità di somministrazione: tramite intervistatore esterno fuori dall'ambulatorio n° 258; compilati dall' utente n° 519. Variabili socio-demografiche: sesso: 58% femmine. Età: 0-24 anni = 3%; 25-44 anni = 34%; 45-64 anni = 35%; oltre = 26%. Scolarità: obbligo 40,3%; superiori 44,9%; laurea 10,5%. Nazionalità: 98% italiana. Nel grafico vengono riportati i customer indices relativi agli items del driver "Soddisfazione dell'organizzazione dell'ambulatorio presso cui ha effettuato il prelievo" (5):
semplicità nel raggiungere l'ambulatorio (5.1), tempo (5.2) e comfort (5.3) in sala d'attesa, rispetto della privacy (5.4), cortesia (5.5) e professionalità (5.7) dei prelevatori, comfort sala prelievi (5.6), possibilità di parcheggio (5.8).
I customer indices relativi agli items del driver 5 non



sono influenzati dalla scolarità, le femmine sono meno soddisfatte della privacy (3,8 vs 4,0) e < 24 anni della cortesia (4,1 vs 4,6). Gli esami sono stati prescritti nel 70% dai medici di famiglia e nel 30% da specialisti. Le informazioni su come fare la prenotazione e dove fare l'esame non erano esaurienti nel 34% e 44% dei casi rispettivamente. Il 50% degli utenti abituali trovano migliorato il servizio dopo la certificazione; il giudizio risente tuttavia della modalità di somministrazione (index intervistati 4,4 vs 3,7 dall'utente), della scolarità (index laureati 4,4 vs 3,8 obbligo) e dello stato di salute.
Il questionario utilizzato si è dimostrato valido perché ha permesso sia di definire piani di miglioramento sui processi governati dai laboratori che di attivare miglioramenti proattivi a livello di direzione aziendale.

087

IL CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO (CQI) NEL LABORATORIO DI IMMUNOMETRIA CON UTILIZZO DI UN NUOVO MATERIALE DI CQI

Ursicino N., Angelucci C.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, OGP "S.Camillo dè Lellis" ASL RIETI1

L'esecuzione del CQI e della valutazione esterna di qualità (VEQ) nel laboratorio analisi è un obbligo di legge e un requisito obbligatorio per conseguire l'Accreditamento o la Certificazione.
L'esecuzione del CQI ha lo scopo di tenere sotto controllo il sistema analitico del laboratorio ed assicurare la correttezza del dato analitico.
Il CQI deve essere eseguito quotidianamente in ogni seduta analitica inserendo i campioni di controllo nella routine tra i sieri dei pazienti.
Per il CQI si utilizzano materiali di controllo a titolo noto che vengono preparati di solito da materiale umano modificato chimicamente in modo che contengano tutti gli analiti da controllare.
Il problema dei materiali di controllo è rappresentato dalla "commutabilità", cioè dal diverso comportamento analitico rispetto ai sieri veri, dovuto all'effetto matrice.
Organizzare un programma di CQI nel settore di Immunometria è più complesso che in altri settori ed in particolare devono essere tenuti in debito conto:

- la commutabilità dei materiali di controllo;
- le caratteristiche degli analiti da dosare;
- la difficoltà di disporre di un materiale di controllo unico che contenga tutti gli analiti da controllare.

Dal 2004 abbiamo implementato il programma di CQI nel settore di immunometria del nostro laboratorio utilizzando nuovi materiali di controllo distribuiti da Medical Systems S.p.A. (Genova): DicoCARE CQI (Dynamic Interactive Control Operations di Care S.r.l.). I materiali di controllo DicoCARE CQI hanno le seguenti caratteristiche:

- sono campioni a valore assegnato, determinato in base ai dosaggi effettuati sullo stesso materiale di controllo dai laboratori italiani partecipanti al programma di VEQ DicoCARE, organizzato da Care S.r.l. e distribuito da Medical Systems S.p.A.;
- sono ricavati da siero umano non trattato, in modo da ridurre il più possibile l'effetto matrice;
- contengono anche analiti, ad esempio Osteocalcina, PAP e ACTH, difficili da reperire in altri materiali di controllo usati finora.

La verifica della ricaduta sulla qualità del laboratorio di questo nuovo programma di CQI è in corso di valutazione e sarà oggetto di studi più esaustivi una volta raccolti dati statistici significativi.
BIBLIOGRAFIA
Besozzi M, Bolelli G, Borsotti M, Leone L, Messeri G, Motta R, Prencipe L, Tocchini M. Il Controllo di Qualità in Chimica Clinica: le basi, gli obiettivi, il disegno. Biochimica Clinica 1995;19:372-400

088

SPECIFICHE DI QUALITA' BASATE SULLA VARIABILITA' BIOLOGICA:UNA APPLICAZIONE AL SISTEMA ANALITICO STREAMLAB®

Cocco C., Marini M., Bertolani M., Soldati M., Da Prati E., Rizzotti P.

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, O.C.M., Azienda Ospedaliera di Verona.

Scopo:L'area di chimica clinica del nostro Laboratorio è stata recentemente riorganizzata in seguito all'introduzione di due sistemi analitici StreamLAB® (Dade-Behring). Ciascun sistema consente il consolidamento di 4 Analizzatori Dimension RxL (Dade-Behring) in un'unica stazione di lavoro. La sicurezza e la rapidità della fase di validazione sono strettamente correlate alla capacità di mantenere sotto controllo le caratteristiche analitiche questi strumenti ad alta produttività. Poiché la gestione moderna della qualità comporta molto più del semplice controllo di qualità statistico si è voluto confrontare le prestazioni effettive di imprecisione analitica rilevate nell'arco di un anno rispetto alle specifiche di qualità per l'imprecisione basate sulla variabilità biologica.
Materiali e Metodi: Sono stati presi in considerazione n=29 analiti di chimica clinica e sono state studiate le caratteristiche di imprecisione analitica. Dall'analisi dei dati relativi al controllo di qualità interno del 2003 sono stati ricavati i coefficienti di variazione (CVa) dei diversi parametri biochimici. Sono stati quindi definiti gli obiettivi analitici di imprecisione sulla base dei dati di variabilità biologica a tre livelli di qualità: desiderabile (CVa $\leq$ 0,50 x CVbi), sufficiente (CVa $\leq$ 0,75 x CVbi), ottimo (CVa $\leq$ 0,25 x CVbi). Gli analiti sono stati poi classificati in funzione della loro adesione alle specifiche di qualità.
Risultati e Discussione: Il confronto fra le prestazioni rilevate nel corso del 2003 e le specifiche di qualità basate sulla variabilità biologica ha fornito i seguenti risultati: Il 59% (n=17) degli analiti è risultato entro il livello di qualità desiderabile, il 10% (n=3) entro il livello sufficiente, il 7% (n=2) entro il livello ottimo. Per il 24% degli analiti (n=7) non è stato possibile il raggruppamento entro le specifiche di qualità basate sulla variabilità biologica. Si tratta di analiti (Na, Cl, Ca, Mg, Bil. neonatale, TIBC, Albumina) in cui, in linea generale , la tecnologia disponibile non consente il raggiungimento dei traguardi analitici oppure non esistono dati affidabili di variabilità biologica. In questi casi è opportuno applicare altre specifiche di qualità gerarchicamente inferiori secondo quanto stabilito nella Consensus Conference di Stoccolma (1999).
Considerazioni conclusive: I risultati ottenuti hanno evidenziato la validità dell'applicazione al sistema analitico StreamLAB® delle specifiche di qualità relative alla imprecisione basate sulla variabilità biologica.
Bibliografia: Fraser CG. Biological Variation: from principle to practice. Washington, DC: AACC Press 2001.

089

CONTROLLO DI QUALITÀ TRA LABORATORI DELLA STESSA PROVINCIA COME STRUMENTO DI CONTROLLO PER LA QUALITÀ DEL DATO ANALITICO

Antonelli F.*, Bonini F.**, Leoni A.**, Martinelli C**.

*Servizio Patologia Clinica P.O. Cecina; **Servizio Patologia Clinica P.O. Livorno

Il concetto di qualità viene oggi inteso in senso molto ampio e può essere descritto definendo la qualità come il rapporto tra le prestazioni fornite e i bisogni di chi le ha richieste. Quindi qualità totale
Nell'approccio alla qualità globale di laboratorio in questo lavoro, abbiamo approfondito oltre al controllo della qualità analitica, inteso come meccanismo interno di miglioramento, anche la correlazione analitica tra strumenti di diversi laboratori, collegati per tipologia di attività, reagenti utilizzati per una integrazione completa e possibile al fine di garantire:
a) una allineamento tra strumenti dello stesso laboratorio.
b) tra strumenti di laboratorio diversi, che lavorano sia per attività di routine che di urgenza.
c) sicurezza nella validazione di un referto da parte per del personale dirigente, non operante nella struttura richiedente la prestazione. Infatti in questo laboratorio la validazione degli esami eseguiti nel servizio di guardia attiva notturna viene effettuata dal personale dirigente laureato presente nel laboratorio di Livorno.
d) un valido back-up in caso di necessità, utilizzabile, tra le due strutture, grazie all'integrazione del sistema informatico
Il sistema di controllo è stato costruito nel settore di chimica clinica secondo il seguente schema:

- un campione casuale è testato prima di iniziare la seduta per tutti gli analiti in elenco;
- lo stesso campione inviato e inserito nella routine del laboratorio di Livorno.

L'utilizzo dello stesso sistema informatico gestionale, permette un facile trasferimento di dati tra le strutture.
In fase iniziale i risultati ottenuti per i singoli strumenti n° 2 Hitachi 917 per Cecina, sono confrontati inserendo i dati in un foglio di calcolo, dove il sistema verificava la media dei campioni, calcola i valori d'accettabilità tenendo conto dei limiti impostati. In una fase iniziale i valori di Cv % e Ds applicati erano quelli riportati dalle carte di controllo degli strumenti (Controlli interni Roche), quindi dopo una prima raccolta di dati adattati alla media dei CV% e Ds elaborata mensilmente dai dati di correlazione e verificata annualmente.
Il sistema permette di evidenziare visivamente i dati corretti e quelli che presentano criticità, che necessitano di un intervento. La stessa metodologia è applicata sui 3 strumenti di Livorno (due 917 e un Modular)
In un secondo tempo sono inserita tutti i risultati in un foglio di calcolo adottando la media dei CV% e Ds di tutti gli strumenti in uso (n° 5).
L'inserimento dei dati fornisce analoghe informazioni quindi non solo l'accettabilità dei valori, ma in caso di non accettabilità permette di identificare quale strumento sta lavorando con condizioni non idonee a mantenere la giusta variabilità analitica.

090

FASE PRE-ANALICA: COMPORTAMENTO DEI LABORATORI IN PRESENZA DI EMOLISI, BILIRUBINA E TORBIDITA'

[1]Zardo L., [1]Secchiero S., [1]Sciacovelli L., [2]Rettondini M., [1]Plebani M.

[1]Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV), Laboratorio Analisi, USSL 20, S. Bonifacio (VR) per il Gruppo di Lavoro.

Nell'ambito dei Programmi di VEQ gestiti dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB) e sulla base delle problematiche evidenziate dai partecipanti e dai coordinatori dei programmi, sono stati attivati Gruppi di Lavoro per approfondire le tematiche individuate e promuovere le opportune azioni correttive. Scopo di questo lavoro è riportare i risultati ottenuti dall'indagine promossa da un gruppo di lavoro relativamente al comportamento dei laboratori in presenza di campioni con interferenza da emolisi, bilirubina e torbidità. Sono stati coinvolti, su base volontaria, 26 laboratori ed è stata avviata una duplice indagine: a) valutazione delle procedure di sorveglianza attuate nei laboratori mediante l'invio di un questionario; b) valutazione della concordanza tra laboratori nel riconoscimento e classificazione del tipo di interferenza e nell'adozione di azioni correttive, mediante l'invio di 10 campioni di plasma a vari gradi di interferenza. I risultati evidenziano che: a) la maggior parte dei partecipanti (81%) dichiara di seguire precise procedure in presenza delle interferenze considerate. Di questi il 50% utilizza procedure scritte senza l'ausilio di indicatori (20%) o in associazione ad indicatori (il 10% usa una scala cromatica, il 20% serum index). La conseguente azione correttiva viene inserita manualmente dal 65% dei partecipanti e mediante utilizzo del sistema gestionale dal 20%, (il rimanente 15% non ha risposto); b) la maggior parte dei laboratori concorda nell'individuare il tipo di interferenza. Nell'assegnazione del grado di interferenza la concordanza fra i laboratori varia in relazione alla quantità di interferente. Per esempio, nel caso di due campioni (H1 e H2), nei quali la presenza di emolisi è riconosciuta dal 100% dei laboratori, si osserva che nel campione H1, il 91% riconosce un grado forte/fortissimo e il 9% moderato, mentre nel campione H2, il 34% forte/fortissimo, il 52% moderato ed il 13% lieve. Per quanto riguarda le conseguenti azioni correttive messe in atto, nel caso del campione H1, il 34,8% ripete il prelievo, il 23,1% referta i risultati segnalando la presenza di emolisi e/o la non attendibilità dei risultati, il 17,4% non esegue alcune analisi (AST, ALT, LDH, ecc.) mentre il 21,7% non dichiara alcuna azione correttiva.
L'analisi dei risultati di questa indagine evidenziano la necessità di migliorare la concordanza tra i laboratori. L'attiva collaborazione tra i coordinatori dei programmi di VEQ e i partecipanti può sicuramente contribuire a migliorare questi aspetti mediante la stesura di opportune linee guida operative.

- Clin Chem Lab Med 199;37:S282.

091

ERRORI NELLA FASE PRE- E POST-ANALITICA: TRASCRIZIONE DELLE RICHIESTE E COMMENTI INTERPRETATIVI INSERITI NEL REFERTO.

Sciacovelli L.(1), Alborino F. (2), Bacelle L. (3), Bonadonna G. (4), Buttarello M. (5), Carraro P. (5), Da Rin G. (6), Gion M. (7), Manoni F. (8), Pieserico G. (9), Plebani M. (1-5).

(1)Centro Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV), (2)P.O. di Dolo (VE), (3)P.O. di Camposampiero (PD), (4)P.O di S. Bonifacio (VR), (5)Dpt. Medicina di Laboratorio-A.O. di Padova, (6)P.O di Treviso, (7)P.O di Venezia, (8)P.O di Monselice (PD), (9)P.O di Montebelluna (TV).

L'errore di laboratorio può avere origine nelle diverse fasi del processo ed avere conseguenze cliniche rilevanti per la salute del paziente. La comprensione delle cause di errore rappresenta la prima tappa per il miglioramento e la promozione della qualità totale in laboratorio. Scopo di questo lavoro è la valutazione dell'errore che origina nelle fasi pre- e post-analitica del processo. In particolare è stata avviata una duplice indagine: a) valutazione della frequenza di errore nella trascrizione dell'impegnativa medica; b) valutazione della concordanza dei commenti interpretativi e degli algoritmi diagnostici segnalati sul referto di laboratorio.
Sono stati coinvolti 9 laboratori clinici della Regione Veneto e sono stati distribuiti 11 differenti sieri di origine umana raccolti in modo da simulare possibili patologie d'organo. Ai laboratori è stato richiesto di: a) verificare circa 1000 richieste in totale relativamente alla corretta imputazione dell'anagrafica e delle analisi, alla presenza dell'indicazione per reperire l'interessato o il medico richiedente, alla presenza dell'indicazione del sospetto diagnostico, all'esattezza della data di ritiro del referto: b) di analizzare i campioni distribuiti ed aggiungere un commento interpretativo al referto.
I risultati evidenziano: a) una frequenza di errore maggiore per quanto riguarda l'inserimento delle analisi richieste (3.15%) rispetto all'anagrafica (0,46%). Risulta mancare quasi sempre l'indicazione del sospetto diagnostico (da 21% a 87%) e l'indicazione per reperire il paziente (48%) mentre una percentuale minore si riscontra per quanto riguarda il medico curante (da 0,4% a 2.8%) e la data di ritiro del referto (da 0% a 2.4%); b) una generale concordanza fra i risultati analitici ottenuti, mentre una maggior dispersione relativamente agli intervalli di riferimento utilizzati. Le differenze osservate non sembrano comunque influenzare, l'inquadramento del campione dal punto di vista clinico.
I risultati di questa indagine dimostrano che è necessario individuare opportune modalità per tenere più efficacemente sotto controllo la fase di imputazione delle richiesta, per definire gli intervalli di riferimento e formulare i commenti interpretativi. I Programmi di VEQ, opportunamente disegnati, possono rappresentare un valido strumento educativo per migliorare questi aspetti e stimolare il confronto e la discussione fra i professionisti.
-Bonini P., Plebani M., Ceriotti F., Rubboli F. Errors in Laboratory Medicine. Clin Chem 2002;48,5:691-98.

092

IL GLUCOSIO NELLA DIAGNOSI DEL DIABETE

Incorvaia L.R. [1] – Sangiorgi Z.[2]

1.Gruppo Controllo Qualità -Pol. S.Orsola-Malpighi- A.O. di Bologna- 2. Dip. Med. Clin. –Univ. Bologna

La glicemia è il parametro laboratoristico principale per: diagnosi, screening (dei soggetti ad alto rischio) e monitoraggio del diabete. Tra le principali **linee guida** citiamo quelle stilate da: American Diabetes Association (ADA) e World Health Organization (WHO).
I **limiti diagnostici decisionali sono:**

- Glicemia a digiuno: **126 mg/dl**
- Glicemia casuale: **200 mg/dl**
- Glicemia dopo carico di glucosio: **200 mg/dl**

Nel soggetto sano la glicemia varia con l'età, pertanto i valori di riferimento proposti sono:
Bambino: 60-100 mg/dl **Adulto: 74-106** mg/dl
Il Programma di VEQ organizzato dall'Azienda Ospedaliera di Bologna si è dimostrato nel tempo un affidabile osservatorio sulla qualità analitica dei laboratori e dei metodi più frequentemente utilizzati.
In un'ottica di rigore scientifico la valutazione dei risultati viene fatta prevalentemente in funzione del principio metodologico alla base dei sistemi utilizzati. La percentuale di utilizzo di questi ultimi riguardo al dosaggio del glucosio si può così riassumere: 62% GOD-PAP (CV medio pool 6.2%), 26% Enzimatico uv (CV medio pool 4.6%), 9.8% Chimica Secca (CV medio pool 3.8%), 0.2 % Polarografico (CV medio pool 2.9%). Un Programma di Controllo che vuole incidere sulla qualità deve necessariamente porsi degli obiettivi e questi sono tanto più validi quanto più sono supportati da criteri scientifici condivisi, attualmente quello che riscuote il maggior consenso è la definizione di limiti di accettabilità basati sulla variabilità biologica (Vb). Nel caso specifico del **glucosio,** la **variabilità biologica media intra-individuale** adottata dal nostro Programma è pari al **6.2%** e di conseguenza il traguardo per l'**imprecisione** (CV%) sarà uguale al **3.1 %.** Questo obiettivo è stato raggiunto negli ultimi 5 anni dal 65% dei laboratori. Per quanto riguarda l**'inaccuratezza** si è preferito optare verso limiti di accettabilità calcolati in funzione dell'intervallo di riferimento (IR) secondo quanto proposto da Tonks; si è adottato uno scarto percentuale pari a 1/8 dell'intervallo di riferimento medio. Applicando questa formula all'IR medio per il glucosio (62-110 mg/dl) inteso come media dei limiti inferiore e superiore degli IR adottati dai laboratorio, si ottiene che 1/2 Tonks è pari a **± 7%**. Per il glucosio si rileva che circa l'80% dei risultati rientrano nei limiti di accettabilità. Un'ultima annotazione riguarda la **verifica degli intervalli di riferimento** comunicati dai laboratori: la situazione che emerge indica nel complesso una accettabile sintonia con quanto proposto dall'ADA. Infatti, mentre per il limite inferiore si assiste ad una scelta orientata verso valori inferiori a 70 mg/dl, per quello superiore il 90% dei laboratori adotta un valore compreso tra 105 e 110 mg/dl a fronte di uno consigliato pari a 106 mg/dl.

093

ANALISI DI UNA PROCEDURA:
IL CONSENSO INFORMATO

Pascucci I., Barretta E.*, Borrelli R.*, Carratù M.*, Iorio A.*, Majolo M.*, Montegrosso S.*, Negrone M.*, Pellegrino A.*, Vertullo C.*, Sacchetti L.

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche Facoltà di Medicina e Chirurgia Ateneo "Federico II" Napoli
*Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva Direttore Prof. Maria Triassi
Facoltà di Medicina e Chirurgia Ateneo "Federico II" Napoli

La normativa vigente e contestualmente la Norma ISO9001:2000 focalizzano sempre più l'attenzione sul Cliente e, in particolare, sulla comunicazione all'utenza. Il tipo di informazione che presenta maggiore criticità è l'informazione in relazione all'atto medico: la raccolta del Consenso Informato, ove previsto e/o necessario. Sinora, non sono state redatte linee guida universalmente condivise. Abbiamo sottoposto la procedura di raccolta del Consenso Informato ad un'analisi critica, basata non soltanto sulla tutela della professione, quanto sulla reale conoscenza e consapevolezza dell'atto medico, percepita dal paziente, con l'obiettivo di poter identificare eventuali ipotesi di miglioramento, orientate ad una partecipazione consapevole del paziente, da sottoporre alle figure preposte all'organizzazione sanitaria. Abbiamo analizzato le procedure di raccolta del consenso informato in vigore in alcune strutture sanitarie pubbliche della regione Campania e di alcune regioni dell'Italia Centrale. Le strutture sono state campionate in base alla complessità (≥ 600 posti letto). Sono stati valutati i contenuti e le modalità di raccolta dei consensi in uso presso diverse Aree: Diagnostica, Chirurgica, Medica, con particolare attenzione ai protocolli di sperimentazione farmacologica in Oncologia. Da un'attenta analisi della normativa in materia di protezione dei dati personali, e dalla presa visione, ove possibile, delle Linee Guida esistenti, abbiamo identificato alcuni requisiti di qualità ed abbiamo evidenziato i punti critici della procedura. Il giudizio di "conformità" e "non conformità" è stato assegnato in base al possesso dei requisiti individuati. I campioni esaminati sono risultati conformi per il 77.6%, considerando "conformi" i consensi con almeno sei requisiti su dieci rispettati. Pur risultando la procedura applicata in maniera uniforme nelle differenti aree si evidenzia che tuttora la raccolta del Consenso viene vissuta come un adempimento burocratico nella relazione medico-paziente. Sarebbe indicato, quindi, che le Direzioni Generali e le Direzioni Sanitarie si adoperassero in tal senso ed invitassero a non considerare la procedura come un momento formale ma ad orientare il colloquio o l'informazione prioritariamente sul paziente, più che sulla patologia, ricordando che ogni paziente è un paziente diverso.

Riganti C. et al. Ann. Ig. 2003;15:383-391.

094

LA VALUTAZIONE DEI FORNITORI COME STRUMENTO PER AUMENTARE LA PARTNERSHIP E COME STRUMENTO DI GESTIONE DELLE GARE PER L'ASSEGNAZIONE DELLE FORNITURE

Bonini F.*, Fiorini M.*, La Gioia A.*

*Servizio di Patologia Clinica P.O. Livorno

Nel Servizio di Patologia Clinica di Livorno è eseguita una valutazione dei fornitori annua, con cadenza trimestrale, analizzando i seguenti parametri di valutazione:

1. AFFIDABILITA' STRUMENTALE (fermi macchina ricavabili da scheda di manutanzione)
2. AFFIDABILTA' DELLE CONSEGNE
3. CONGRUITA' DELL'OFFERTA ECONOMICA (valutazione annuale della redditività dei kit)
4. QUALITA' DELLE FORNITURE (Tipo e frequenza delle non conformità in accettazione e in produzione)
5. QUALITA' DEL SUPPORTO DELLO SPECIALIST
6. QUALITA' DELL'ASSISTENZA TECNICA
7. ATTEGGIAMENTI DI COLLABORAZIONE, DISPONIBILITA' E CORREZIONE NC (annuale)

Si calcola in indice di affidabilità dal quale si ricava un giudizio.
Tutti i dati sono raccolti in un modulo del Sistema Qualità inserito nella rete intranet e contestualmente ciascuna Sezione del Laboratorio compila, telepaticamente il modulo delle Non Conformità del Fornitori, per dare evidenza oggettiva del risultato della valutazione.
Tutti i dati sono inseriti in un foglio di calcolo che elabora e fornisce grafici che rendono evidente l'andamento delle prestazioni dei Fornitori nel tempo.
Queste valutazioni sono inviate alle Ditte semestralmente: questo ha aumentato il rapporto di partneship, permettendo di operare eventuali correttivi ed è un utile strumento di valutazione per le gare di Service.

095

MONITORAGGIO DEL " CAPABILITY INDEX " NELLA DETERMINAZIONE DELLA TROPONINA IN CHEMILUMINESCENZA

Bertolo M.,Rubatti C.,Carletto R., Torelli A., Zoppè M.

Laboratorio analisi chimico cliniche e microbiologia Settore Bioch.Clinica, Ospedale di Chivasso,Torino.

Introduzione
Il "capability index" (indice di capacità Cpk) permette di verificare l'attitudine di un processo a rispettare i limiti di tolleranza prefissati. Alcuni autori ne propongono l'utilizzo in campo clinico-diagnostico dopo aver dimostrato la sostanziale equivalenza con l'approccio più noto basato sul TEa (errore totale accettabile). Il calcolo del Cpk può così essere considerato un metodo semplice ed intuitivo per monitorare l'imprecisione e il bias di una serie di misurazioni ed in generale di un processo.

Materiali e metodi
Si è analizzato per circa un anno il materiale di controllo PreciControl Cardiac - Roche (cTnT = 0,14 ng/ml con intervallo 0.10÷0.18) sul sistema Elecsys 2010 - Roche. I risultati sono stati riportati giornalmente su una carta di controllo X/R a punti singoli e range mobile. Periodicamente sono stati calcolati la deviazione standard σ ed i limiti statistici di processo inferiore e superiore (LCL e UCL). La gestione del processo è stata condotta in modo da rispettare i suddetti limiti in assenza di tendenze anomale. Per il calcolo del Cpk inferiore e superiore (Cpki e Cpks) si sono usate le seguenti formule:

$Cpki = (X - 0.10) / 3\sigma \quad Cpks = (0.18 - X) / 3\sigma$

dove X è la media delle misurazioni.

Risultati
Le misurazioni eseguite nella pratica routinaria hanno generato una $\sigma = 0.006$ pari ad un CV% tra giorni = 4.3 %. Il calcolo del capability index ha fornito in gran parte valori di Cpki e Cpks coincidenti e ≥ 2 suggerendo l'assenza di bias ed un'attesa di letture fuori dall'intervallo del controllo pari a 0.002 DPM (difetti per milione). Ciò corrisponde al raggiungimento dell'obiettivo " 6 sigma" nelle analisi ripetute del materiale di controllo con riferimento ai limiti forniti dalla Ditta. In altri casi Cpki e Cpks non sono risultati coincidenti, dimostrando la presenza di un bias. Il loro valore è risultato comunque > 1.5 (meno di 6 DPM).

Conclusioni
Il Cpk può essere un utile indicatore per valutare le prestazioni di un sistema che operi sotto controllo statistico. Applicato al dosaggio della troponina in chemiluminescenza ha evidenziato i buoni risultati in accuratezza e precisione del sistema analitico considerato, in accordo con la letteratura.

Rif: Burnett L. et all. Clin.Chem 1996;42:2035-7

096

TOLLERANZA AL GLUCOSIO, INSULINO - RESISTENZA E STATO INFIAMMATORIO IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA.

Maiavacca R., Colombo C*., Tirelli A.S., Felicetta I., Rocchi A*., Bennato V*.,Costantini D*., Arnaboldi E., Torresani E.

Laboratorio di Chimica Clinica-– I.C.P.- Milano.
*Centro Fibrosi Cistica, Università di Milano.

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia ereditaria che interessa principalmente i polmoni e il pancreas. La diagnosi precoce, la terapia dell'insufficienza pancreatica, la prevenzione ed il trattamento dell'infezione polmonare cronica hanno notevolmente aumentato la sopravvivenza dei pazienti affetti da FC rendendo evidenti alcune complicanze a lungo termine della malattia. Il diabete mellito e la ridotta tolleranza al glucosio sono diventate complicanze comuni e possono avere un impatto negativo sullo stato di salute e sull'aspettativa di vita di questi pazienti. Scopo del nostro lavoro è stato quello di definire la relazione eventualmente esistente tra grado di tolleranza al glucosio, insulino-resistenza e stato infiammatorio in pazienti con FC. Sono stati studiati 83 pazienti con FC (46 maschi e 37 femmine) di età variabile tra 8 e 32 anni seguiti presso il centro FC della nostra A.O. Per valutare il grado di tolleranza al glucosio e l'insulinoresistenza, tutti i pazienti sono stati sottoposti a OGTT (oral glucose tolerance test) consistente in sette prelievi di sangue (basale e ogni 30' per 3 ore) sui quali sono stati effettuati dosaggi di glucosio (metodo alla GOD) e di insulina libera (metodo immunoelettrochimico). Nello stesso tempo, per valutare lo stato infiammatorio bronchiale, sono stati dosati sull'espettorato i livelli di interleuchina (IL8) (metodo immunoenzimatico ELISA). Sulla base dei valori di glucosio basale e dopo 2 ore durante OGTT i pazienti sono risultati: 68% normotolleranti (NGT), 16% con ridotta tolleranza al glucosio (IGT) e 16% diabetici (DM) con una prevalenza di NGT nel gruppo 8-15 anni, di DM nel gruppo 16-20 anni e con una distribuzione simile di DM e IGT nel gruppo > 20 anni. Analizzando i valori di glicemia in OGTT nelle tre classi di pazienti (NGT, DM, IGT) si riscontra in 5 soggetti della classe DM una curva glicemica da carico indicativa di diabete nonostante i valori normali di glicemia a digiuno il che sottolinea l'importanza di eseguire l'OGTT come test di screening per il diabete nella FC. La resistenza all'insulina, valutata mediante gli indici di sensibilità, (HOMA-IS e QUICKI) è risultata non correlata all'andamento dei dati dell'OGTT e solo parzialmente correlata ai valori di IL8 nell'espettorato. In conclusione i dati rilevati indicano che la tolleranza al glucosio peggiora con l'età. L'insulino-resistenza non sembra essere la principale causa dello stato di intolleranza al glucosio, ma potrebbe essere indotta dallo stato di infiammazione bronchiale.

097

PARAOXONASE GENE POLYMORPHISM (PON1 192) IS ASSOCIATED WITH ENDOTHELIAL FUNCTION IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES

1 Liberatoscioli L.; 1 Mannucci L.; 3 Irace C.; 3 Fiaschi E.; 1,2 Federici G.; 3 Sesti G.; 3 Gnasso A., 1 Cortese C.

1 Dipartimento di Medicina Interna, University of Tor Vergata, Rome, Italy
2 Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Laboratory of Clinical Biochemistry, Rome.
3 Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica "G. Salvatore", "Magna Græcia" University, Catanzaro, Italy

Objective Endothelial dysfunction is frequent in diabetic patients and may be related to increased oxidation of circulating LDL. Paraoxonase (PON1) is an HDL-linked anti-oxidant enzyme whose activity is influenced by a genetic polymorphism at codon 192 resulting in a Gln to Arg change. In the present study, we have investigated the possible association between the PON1 polymorphism and the endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus.
Research Design and Methods Sixty-nine diabetic patients and 41 sex- and age-matched controls were enrolled. The PON1 Gln192Arg polymorphism was determined by PCR amplification and restriction enzyme analysis. Endothelial function was evaluated by flow-mediated vasodilation (FMD) of the brachial artery after forearm ischemia. Data were analyzed according to the presence or absence of the Arg allele of the PON1 gene.
Results In the control group, no difference was observed in FMD between subjects homozygous for the Gln allele and those carrying the Arg allele. In the diabetic group, FMD was lower among those carrying the Arg allele compared with homozygous for the Gln allele (1.90±1.65% vs. 3.69±2.40%; p=0.02). This difference was even more significant after exclusion of subjects with hypertension (2.01±1.27% vs. 5.72±3.24%; p=0.01). In a multiple regression analysis, hypertension and PON1 gene polymorphism were independently associated with FMD.
Conclusions The present findings suggest that the Gln/Gln genotype of the PON1 gene is associated with improved FMD in diabetic patients, consistent with a more effective antioxidant and supposedly protective action on circulating LDL of this variant.

098

PLATELET ACTIVATION IN HAEMODIALYSIS PATIENTS

Giacomini A.; Urso M.; Antico F.; Valverde S.; Munaretto G.; Gessoni G.

Department of Clinical Pathology, Haemodialysis Service, Chioggia Hospital, Chioggia (VE).

Introduction. End-stage renal disease (ESRD) is associated with an increased risk of atherosclerotic cardiovascular disease which can be partially explained by excessive platelet activation. In particular, during haemodialysis (HD), platelet activation is the result of contact between blood and prosthetic devices. This phenomenon, which has mainly been investigated by fluorescence flow-cytometry, can now be studied in vivo by a two-angle light scatter analysis using the automated haematology system ADVIA 120. The system provides platelet parameters both traditional, like platelet count (PLT) and volume (MPV) and new, such as mean platelet component (MPC). MPC, based on the measure of average platelet density, is an index of platelet activation which can be a useful alternative for fluorescence flow-cytometry in the clinical laboratory setting.
Aims. The purpose was to study platelet activation in HD patients by comparing patient and reference subject platelet parameters determined by ADVIA 120, and to investigate the effect of dialysis on platelet activation status.
Materials and methods. 32 HD patients, 17 males and 15 females, mean age 66 years, were recruited into the study. Nine patients were on treatment with antiplatelet agents. Mean time of dialysis was 58 months. The patients were treated with a 4 hour dialysis: 16 patients with cellulosic and 16 with synthetic membranes. Blood samples were taken from each HD patient before and immediately after dialysis. Blood was drawn into Vacutainer tubes containing CTAD, held at 4ºC and analysed by ADVIA 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) 30 to 90 minutes after venipuncture.
HD patients were compared with reference subjects matched for sex and age (n=34). The following platelet parameters were measured: PLT, MPV and MPC. The Kolmogorov-Smirnov test was used to ascertain sample matching; data were then analysed by ANOVA models.
Results. When comparing patient to reference samples, no significant difference was found for PLT and MPV, whereas MPC was significantly lower in patients (males: $p<0.001$, females: $p<0.001$). A significant decrease of MPC during dialysis sessions was found (males: $p=0.012$, females: $p=0.036$), whereas other parameters showed no significant variation. Moreover, no relation between MPC change and membrane type was found.
Conclusion. From our experience platelet density, as measured by MPC, proved to be useful for assessing platelet activation in vivo, overcoming the inconveniences inherent in fluorescence flow-cytometry. Follow-up studies are necessary to be able to correlate MPC values to cardiovascular risk in HD patients.
Reference. Ashman N. et al. Nephrol Dial Transplant 2003; 18:2088-96

099

PLATELET ACTIVATION IN MYELOPROLIFERATIVE SYNDROMES

Giacomini A.; Battista R.; Valverde S.; Antico F.; Gessoni G.

Department of Clinical Pathology, Haematology Service Chioggia Hospital, Chioggia, (VE)

Introduction. Myeloproliferative syndromes (MPS) are associated with an increased risk of thromboembolic and bleeding complications, which have been attributed to platelet function abnormalities. Several studies, based mainly on fluorescence flow-cytometry, support the concept of platelet hyper-reactivity in MPS. Platelet activation can now be detected in vivo by the two-angle light scatter platelet analysis of the automated haematology system ADVIA 120. This system provides platelet parameters both traditional, such as platelet count (PLT) and volume (MPV) as well as innovative, like mean platelet component (MPC). MPC, based on the measure of average platelet density, is an index of platelet activation, and proves to be a useful alternative of fluorescence flow-cytometry in the Clinical Laboratory setting.
Aims. Our aim was to study platelet activation in MPS patients by comparing patient and reference subject platelet parameters as determined by ADVIA 120.
Materials and methods. Patients (n=21, 12 males and 9 females, mean age 64 years) with MPS were recruited into the study, including chronic myelogenous leukemia (n=4), polycythemia vera (n=8), chronic myelofibrosis (n=3) and essential thrombocytemia (n=6); two patients were treated with antiplatelet agents. All patients received antiproliferative agents. A control group of 24 reference subjects, matched for sex and age with patients, was also enrolled in the study. Blood was drawn into Vacutainer tubes containing CTAD, maintained at a temperature of 4ºC and analysed by ADVIA 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) between 30' and 90' after venipuncture. The following platelet parameters were investigated: PLT, MPV and MPC. Reference to patient sample matching was stated using Kolmogorov-Smirnov D-statistic; differences of means were tested against Student distribution.
Results. As expected, MPS patients, who were all in antiproliferative therapy, did not present significant differences in PLT and MPV when compared with reference subjects. MPC was significantly lower in patients than in reference subjects (males: p=0.026, females: p=0.025), demonstrating abnormal platelet activation.
Conclusions. Determination of the platelet density parameter MPC using ADVIA 120 confirms the abnormal platelet activation which has previously been studied in research setting using fluorescence flow-cytometry. Follow-up studies in larger series are needed to investigate the relation between MPC and thrombotic complications in MPS patients.
Reference. Villmow, T. et al. Thrombosis Research 2003; 108:139-145

100

APPLICAZIONE DEL SOFTWARE BAYER ADVIA 120 CSF PER L'ANALISI DEL LIQUOR E DEI LIQUIDI BIOLOGICI

D'Altoe' P., Temporin V., Molesini L., Piva E., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Italia

Scopo del lavoro: I conteggi cellulari nei campioni biologici sono tutt'ora eseguiti con metodi manuali che prevedono l'impiego di camere e conteggi microscopici. Questi metodi possono essere causa di inaccuratezza ed imprecisione nei risultati. Materiali e Metodi. ADVIA 120 CSF (Bayer, Tarrytown, NY) è un software applicato all'analizzatore ematologico ADVIA120. Il metodo è semiautomatico e dedicato per l'analisi del liquor, in grado di contare e differenziare le cellule mediante citometria diretta. Il software è stato quindi valutato sia per i conteggi cellulari del liquor ma anche per i conteggi cellulari e la leucometria differenziata applicata ai liquidi biologici. Abbiamo comparato i risultati ottenuti su 40 liquor e 40 liquidi biologici con i metodi microscopici utilizzati nella pratica del nostro laboratorio. Risultati:

LIQUOR n=40

	r	slope	intercetta
RBC	0,99	0,60	-148,18
WBC	0,98	0,76	-16,22

LIQUIDI BIOLOGICI n=40

	r	slope	intercetta	Bias	Media manuale	Media CSF
WBC	0,95	0,94	2,58	-13,0	265,8	273,4
PMN	0,66	0,81	4,13	0,87	16,4%	17,3%
Linfo	0,47	0,79	13,9	8,7	33,17 %	39,20 %
Mon	0,37	0,73	25,32	21,9	28,67 %	35,33 %

Precisione intra serie

N=8	Media	DS	CV%
RBC (#)	136,5	13,6	9,9
WBC(#)	65,0	4,5	6,9
PMN (%)	43,7	3,68	8,41
LINFO (%)	46,06	3,34	7,25
MONO (%)	10,09	2,02	19,97

Precisione tra le serie

N=8	Media (#)	DS	CV%
RBC	139	19,27	13,86
WBC	94,34	4,96	5,25
PMN	60,41	2,11	3,49

Conclusioni: La cellularità ottenuta con il software CSF presenta una buona correlazione con i metodi manuali sia per il liquor che per i liquidi biologici. Data anche la buona precisione, il metodo può essere applicato ai conteggi dei liquidi biologici. Dall'osservazione dei citogrammi forniti, è possibile sospettare e quindi verificare la presenza di eventuali cellule non leucocitarie.

101

CONFRONTO TRA DUE DIVERSE MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE DI FERRO GLUCONATO: STUDIO IN PAZIENTI IN DIALISI PERITONEALE

Ippolito S.[1]; Novembrino C.[2]; Lonati S.[1]; Bamonti F.[1]; De Vecchi A.[3]

Dipartimenti di Scienze Mediche[1] e di Scienze Chirurgiche[2], Università degli Studi di Milano, UO di Nefrologia[3], IRCCS Ospedale Maggiore, Milano

La sindrome uremica è caratterizzata da anemia normocromica normocitica spesso associata a sideropenia con ridotto assorbimento intestinale del ferro. E' stato dimostrato che la somministrazione endovenosa di ferro può comportare effetti collaterali dovuti ad infiammazione e/o a sbilanciato stato ossidativo. (1)
Allo scopo di confrontare, sia dal punto di vista dell'efficacia sia da quello degli effetti sullo stato ossidativo, due diverse modalità di somministrazione, sono stati arruolati 20 pazienti in dialisi peritoneale (10M/10F, età media 60±16 anni). A ciascuno è stato somministrato ferro gluconato (62,5 mg) sia in bolo endovena rapido sia in infusione lenta (in 100 ml di glucosata in 30 minuti) e con un intervallo fra le due modalità di somministrazione nel medesimo paziente di 15-60 giorni. Prima dell'infusione (T0), dopo 30 minuti (T1) e dopo 24 ore (T2) sono stati determinati l'emocromo e gli indici dello stato marziale (metodi routinari), le specie reattive dell'ossigeno e la capacità antiossidante totale (rispettivamente ROS e TAS, metodi spettrofotometrici, Diacron).
I risultati sono riportati in tabella come media ± DS:

		ROS (UCarr)	**TAS** (μmolHClO/mL)	**%Sat transferr**
Bolo	T0	294±108	366±99	24±9
	T1	290±98	350±95	84±20
	T2	286±100	353±95	28±8
Inf Lenta	T0	288±71	363±74	25±7
	T1	284±66	346±80	85±17
	T2	302±79	338±71	32±8

L'analisi statistica (test t di Student) non ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi ai vari tempi considerati. Nel 25% dei pazienti la transferrina risultava, a T1, completamente saturata con entrambe le modalità di somministrazione.
Inoltre, dal punto di vista clinico, nel corso dello studio nessun paziente ha manifestato effetti collaterali seri attribuibili all'infusione di ferro.
I nostri dati non evidenziano né la possibilità di un rischio elevato da stress ossidativo dopo infusione endovenosa di ferro né differenze significative per quanto riguarda effetti indesiderati ed efficacia tra le due modalità di somministrazione.
Riteniamo pertanto che la somministrazione in bolo rapido sia da preferirsi, in quanto meno costosa e meno impegnativa dal punto di vista organizzativo e logistico.

(1) Drueke T. et al. Circulation (2002); 106:2212-7

102

KINETICS OF ENGRAFTING DONOR CELLS IN DIFFERENT NONMYELOABLATIVE PREPARATIVE CONDITIONING REGIMENS AND GVHD

Savino L.; Carella jr A.M; Greco M.M.; Beltrami G.; A.M.Carella

Department of Hematology and Stem Cell Transplantation Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG) Italy.

We report clinical outcome and results of chimerism analysis in 53 patients (32 male, age: 30-60, mean: 47 yrs) with different malignancies (6 HD, 16 NHL, 11 MM, 3 CML, 4 AML 1 CLL, 6 Kidney and 6 Breast cancer) that received different non myeloablative conditioning, followed by allogeneic SCT: 18 Flu/Mel 16 Flu/TBI 19 Flu/Cy. In all cases unmanipulated PBSC from fully matched HLA-identical siblings were used; median number of infused CD34+ cells was $3.30x10^6$/kg (range 0.90-10.61). GVHD prophylaxis consisted of CSP/MTX. Chimerism analysis was performed using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Fifteen STR loci and the Amelogenin locus are co-amplified in a single reaction. Donor engraftment was evaluated on unfractionated peripheral blood (PB), bone marrow samples and on immuno-magnetically selected PB CD3+ cells. Median follow-up was 225 days (34-912). The rates of complete donor chimerism (CDC=>95% donor cells) at day +15,+30, +90, +180, +270, +360 and beyond +360 were 23%, 36%, 60%, 86%, 93%, 93% and 93% respectively. Kinetics of engrafting donor cells was different in the three conditioning regimens. The rate of CDC at days +30 were 73%, 20%, 0%, respectively; at days +90 were 92%, 57%, 0%. Acute GVHD occurred in 5/18 (28%) patients (pts) undergoing Flu/Mel, three of them were grade > II (2 died), while 7/18 (39%) developed chronic GVHD, none of them died of it. In two (12%) pts treated with Flu/TBI protocol, grade III-IV acute GVHD was observed (1 died), chronic GVHD occurred in 7/16 (44%) pts and one of them died of it. Finally in Flu/Cy protocol acute GVHD was absent, while 4/19 (21%) pts developed chronic GVHD. Thirty-two patients (60%) are alive to date. Our study shows that Flu/Mel protocol has an increased transplant related mortality, mainly due to higher incidence of acute GVHD, while chronic GVHD occurred in all three protocols. We cannot put in evidence acute GVHD in patients that underwent Flu/Cy conditioning regimen because at day +90 none of them has achieved complete donor chimerism.

103

SENSIBILITA' DEI FLAGS MORFOLOGICI ERITROCITARI DELL'ANALIZZATORE EMATOLOGICO TOA-SYSMEX XE-2100

Bergonzini G., Ottomano A.M., Davoli E., Campioli D.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche
Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena
Modena (Italia)

Obiettivo.
Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione della sensibilità dei flags morfologici relativi alla serie eritrocitaria, forniti dall'analizzatore TOA-SYSMEX XE-2100 in una casistica ematologica selezionata.
Materiali e metodi.
La casistica utilizzata è stata ottenuta dalla routine ematologica del nostro laboratorio nell' arco di circa un anno ed è costituita prevalentemente da pazienti interni. Sono stati utilizzati solo casi per i quali l'osservazione microscopica è risultata compatibile con le informazioni diagnostiche fornite.
Abbiamo valutato i flags morfologici eritrocitari e la loro corrispondenza con gli elementi citologici attesi.
Risultati
La tabella seguente mostra i risultati ottenuti

Elementi citologici significativi	**N° casi**	**Flag**	**N°**
Eritroblasti	9	NRBC ?	9
Schistociti	17	FRAGMENTS ?	13
GR ipocromici	11	IRON DEFICIENCY ?	6
Sferociti e microsferociti	4	TURBIDITY/HGB INTERFERENCE ?	3

Da tali risultati si ottengono i valori di sensibilità illustrati nella seguente tabella

FLAG	**Sensibilità**
NRBC ?	100 %
FRAGMENTS ?	76 %
IRON DEFICIENCY ?	54 %
TURBIDITY/HGB INTERFERENCE ?	75 %

Conclusioni
La valutazione complessiva dei segnali di alterazioni morfologiche forniti dall'analizzatore XE-2100 è risultata decisamente positiva. L'informazione generata da questo analizzatore si propone come utile strumento di integrazione ed affiancamento all' attività microscopica.

104

"PEPTIDE MASS FINGERPRINTING" DI UNA HB D LOS ANGELES OMOZIGOTE

Terreni A., Flagiello A°., Caldini A., Ognibene A., Balboni F., Luceri F., Pucci P*., e Messeri G.

Laboratorio Centrale di Analisi Biochimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, FIRENZE.
*Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Universita di Napoli Federico II, NAPOLI.
°CEINGE Biotecnologie Avanzate scrl, NAPOLI.

Tra le più comuni emoglobine (Hb), ne esistono alcune, che vengono definite abitualmente come Hb D (D-Los Angeles or D-Punjab, D-Iran and D-Ibadan). Queste Hb sono varianti dell'Hb normale di un adulto (Hb A) e presentano implicazioni cliniche simili. L'Hb D-Los Angeles (1) omozigote si presenta quando il gene per l'Hb D viene ereditato da entrambi i genitori ed è dovuta alla sostituzione Glu→Gln in posizione 121della catena β. I comuni sistemi HPLC dedicati ed automatici non sono in grado di riconoscere in maniera certa questi tipi di Hb e tutte una serie di altre varianti. In questo lavoro viene descritta la caratterizzazione a livello proteico attraverso il mappaggio peptidico di una HbD variante omozigote utilizzando tecniche di spettrometria di massa. L'emolisato ottenuto dai globuli rossi è stato direttamente analizzato in Cromatografia Liquida - Spettrometria di Massa (HPLC-ESI/MS) utilizzando un triplo quadrupolo (Micromass), le singole globine sono state purificate attraverso una cromatografia semi-preparativa utilizzando un HPLC 1100 series (Agilent Technologies) con rivelatore UV 220 nm. Il digerito triptico della globina variante è stato direttamente analizzato in spettrometria di massa con la ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI) su un spettrometro Voyager DE (Applied BioSystems, Boston, MA, USA).
L'analisi ESI/MS ha evidenziato una catena globinica anomala con una massa molecoare di 15,866.24 ± 0.6 Da, il suo tempo di eluizione è minore rispetto alla catena β normale così come la sua massa molecolare è di circa 1 Da inferiore ad essa. L'analisi Maldi/MS della miscela peptidica ha messo in evidenza un peptide anomalo caratteristico con 1.337.7 m/z: considerando la diminuizione di massa di ~ 1 Da, risulta coincidere con il peptide 121-132 con segnale di 1,378.7 m/z presente tra i canonici della tripsina. La presenza di un peptide anomalo che presenta alla sua estremità N-terminale un residuo piroglutammico formato dalla ciclizzazione della glutammina conferma la sostituzione Glu→Gln e non rende necessaria l'ulteriore analisi della sequenza amminoacidica passaggio chiave insieme al mappaggio peptidico della caratterizzazione delle varianti Hb. In conclusione possiamo affermare che un considerevole numero di varianti emoglobiniche può essere caratterizzato con il solo "peptide mass fingerprinting" sfruttando la sede e il tipo di mutazione che possono coinvolgere un sito di taglio enzimatico o generare residui caratteristici.
1. ITANO HA, NEEL JV. A new inherited abnormality of human hemoglobin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1950 Nov;36(11):613-7.

105

ANGIOGENIC FACTORS AND DEREGULATED GENES IN THE MGUS-MM TRANSITION

Greco C., Vona R., Cocco R., Crognale S., Giommi S., Pisani F., Petti MC. And Vitelli G.

Polo Oncologico "Regina Elena", Roma

There is growing evidence that neovascularisation is important not only in solid tumors but also in hematological malignancies.The process of angiogenesis is stimulated or inhibited by a variety of factors whose involvement during the various steps of tumor progression is still unclear. Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignant disorder that develops from a premalignant condition called monoclonal gammapathy of undetermined significance (MGUS) to overt multiple myeloma (MM). Previously, we demonstrated that the transition from benign MGUS to active MM is characterized by changes in cytokines expression as well as by the c-myc gene deregulation (1). Such phenotypic and genotypic features correlate with an increase in M-paraprotein and β2 Microglobulin serum concentration. Aim of the present study was to define the levels of VEGF, basic FGF and PDGF-BB in a well characterized population of patients affected by Plasmacell dyscrasias (n=107), representing different steps of malignant transformation (benign MGUS,high MC-MGUS,smouldering MM, overt MM). Moreover, we wished to examine the relationship between the three angiogenic cytokines and known phenotypic parameters of prognosis, as well as some potential genotypic markers of biological interest. Finally, in a subgroup of treated MM patients, changes in the serum levels of VEGF, bFGF and PDGF-BB were analyzed at diagnosis and during the course of the disease. The detection of angiogenic factors in the serum was performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (R&D System, Minneapolis, MN,USA). c-Myc gene amplification, CDRIII segment rearrangements and k-RAS codon 12 mutation were determined by means of the Southern blot analysis, nested PCR and RFLP-PCR techniques, respectively. A different trend in the serum levels of the three factors is shown by our patients, during the MGUS-MM transition. In particular, an increase of 30-45% in FGF and VEGF levels is early observed in the sera of benign MGUS respect to the healthy controls, while a same increase (44%) is elicited by PDGF-BB in the sera of smoldering -active MM. In MM patients a positive correlation is observed between FGF or VEGF levels and the clinical course of the disease, while high levels of PDGF-BB and c-myc gene deregulation characterize patients refractory to chemotherapy. Taken together our results suggest the usefulness to understand timing and role of these angiogenic factors for a potential clinical use in Plasma cell dyscrasias management.

(1) Greco et al. Cell Prolifer,32,321-328,1999

106

LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA SECONDARIA A MIELOMA MULTIPLO: COMPARSA DI UN RARO QUADRO DI IMMUNOFISSAZIONE

Balboni F., Caldini A.*, Ognibene A.*, Terreni A.*, Gallai R.*, Morrocchi B., Salati A., Innocenti F., Messeri G.*, Bellesi GP.

Laboratorio Analisi e U.O. Ematologia IFCA, Firenze
* Laboratorio Analisi Biochimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze

Paziente di 55 anni, di sesso femminile, a cui viene diagnosticato un Mieloma Multiplo IgGK nell'ottobre 1997. La terapia effettuata consente di raggiungere la remissione clinica nel marzo 2000. Nel maggio 2001 la paziente viene sottoposta a trapianto di midollo autologo. Un anno dopo, nell'ottobre 2002, durante i controlli di routine, si evidenzia una ricaduta di malattia, testimoniata dalla ricomparsa della proteinuria di BJ. La biopsia osteomidollare effettuata nel maggio 2003 rivela un'invasione midollare di plasmacellule che costituiscono il 40% della popolazione cellulare.
Nell'autunno 2003 si instaura una piastrinopenia ingravescente segno della massiccia invasione midollare. L'osservazione al M.O. di allestimenti di sangue periferico mostra la presenza di blasti e una spiccata monocitosi. Nel dicembre 2003 si ha la definitiva trasformazione in leucemia mieloblastica acuta stadio M0.
I livelli di B2 Microglobulina, monitorati nel corso della malattia, mostrano un aumento lieve ma costante. I livelli raggiunti sono comunque di poco superiori all'intervallo di riferimento. Sebbene l'elettroforesi delle sieroproteine, eseguita su gel d'agarosio (Sistema Hydrasis Sebia) non mostri anomalie, l'immunofissazione sierica evidenzia invece la presenza di due componenti monoclonali di cui una, con migrazione in zona α2, costituita da catene K̲libere e la seconda con migrazione in zona γ1 costituita da catene D pesanti libere. Per escludere la presenza di un artefatto dovuto alla frammentazione in vitro di una eventuale immunoglobulina intera IgDK̲ l'immunofissazione è stata ripetuta anche su prelievo con Trasilor ottenendo comunque lo stesso quadro immunologico. La presenza di BJ di tipo K è stata riscontrata a tutti i controlli eseguiti nella fase di ricaduta della malattia.
Da evidenziare in questo caso clinico l'interessante switch di classe della immunoglobulina pesante con produzione da parte del clone neoplastico di due CM di cui una costituta da catene K̲libere e l'altra di raro reperimento costituita da catene pesanti D libere, in sostituzione del quadro iniziale IgGK̲

Guidelines for Clinical and Laboratory Evaluation of Patients With Monoclonal Gammopathies David F. Keren et al. Arch Pathol Lab Med, 123:119-125,1999

107

VALORI DI RIFERIMENTO PER GLI ERITROCITI IPOCROMICI: UN TENTATIVO DI DEFINIZIONE.

Manganiello M., Freggia S., Lelli L., Romanelli A°., De Nes M.°, Pavia T.,Cioppi G., Fulgido V., Pellegrini G., Ruocco L.

U.O. Laboratorio Analisi Cliniche, Cisanello AOU Pisana
° CNR, Area Ricerca S.Cataldo, Ist. Fisiologia Clinica, Pisa

La percentuale di cellule ipocromiche sembra essere un utile, semplice ed economico indice, ben correlato alla carenza di ferro. Scopo dello studio è di individuare i range di normalita' in una popolazione sana.
Dal settembre al dicembre 2003 sono stati analizzati circa 5000 soggetti afferiti al centro prelievi del laboratorio, per eseguire esami per controllo annuale. Sono stati arruolati nello studio 326 soggetti che si presentavano in apparente buona salute, non affetti da patologie croniche ed i cui valori di leucociti, eritrociti (RBC), piastrine, emoglobina (Hb), ematocrito e volume globulare medio (MCV) erano compresi nei range di normalità del laboratorio.
I soggetti sono stati valutati per: età, sesso, RBC, Hb, MCV, concentrazione media di emoglobina cellulare (CHCM)*, quantità di emoglobina cellulare indipendente dal volume (CH)*, la percentuale di eritrociti ipocromici (IPO)*. Gli esami sono stati eseguiti con strumentazione ADVIA 120®, Bayer.
Analisi statistica: ANOVA ad un criterio di classificazione e significativi i valori con $p \leq 0.05$.
Risultati: i soggetti di età 21-93 anni (media:55.4±16.2; 123M: 55.2±15.2; 206F: 55:5±16.9) sono stati suddivisi in fasce di età (20-29:1; 30-39:2; 40-49:3; 50-59:4; 60-69:5; ≥70:6). Differenze significative emerse:

	m vs f	p
Gruppo 2 (m15, f27)	CHCM 35.2±1.2 vs 34.4±0.9	0.0227
Gruppo 3 (m22,f32)	CHCM 35.3±0.87 vs 34.2±1	0.0002
	CH 31.3±1.1 vs 30.3±1.3	0.0065
	IPO 0.23±0.25 vs 0.56±0.57	0.0164
Gruppo 4 (m28, f46)	CHCM 34.9±1.03 vs 34.04±0.95	
	CH 31.0±1.24 vs 30.0±1.5	0.0049
	IPO 0.38±0.59 vs 0.75±0.83	0.047
Gruppo 5 (m26,f40)	CHCM 34.8±1.1 vs 34.2±0.91	0.023
	CH 31.3±1.7 vs 30.7±0.91	0.048

Nei gruppi 1 e 6, i maschi (M) non differivano dalle femmine (F). Variazioni significative di IPO sono risultate associate all'età, sia per i M($p<0.05$) che per le F ($p<0.001$) in particolare per il gruppo 6 vs 2,3,4.
I valori normali della popolazione sana studiata:

gruppi	% ipocromiche	M	F
1	0.1 – 0.5	0.1 – 0.8	
2	0 – 0.6	0 – 1.7	
3	0.1 – 1	0 – 2.2	
4	0.1 – 3	0 – 4.6	
5	0.1 – 2.5	0.1 2.7	
6	(m24) 0.1 – 3	(f66) 0.1 – 5.6	

Dallo studio è anche emerso che:
- i soggetti di età superiore a 69 anni hanno una percentuale più elevata di cellule ipocromiche;
- da 60 anni in poi, i M e le F non differiscono tra loro per la percentuale di cellule ipocromiche.

Brugnara C., Clin Chem 2003;49:1573-1578; Thomas C., Clin Chem 2002;48:1066-1076.

108

IRON CONTENT OF FERRITIN IN A GROUP OF CHRONIC HAEMODIALYSIS PATIENTS

°Scatena R., °De Sole P., °Rossi C., *Spada P., *Schiavone R., *Vulpio C.

°Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica - *Istituto di Clinica Chirurgica, Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

The iron storage protein ferritin is ubiquitous among living species and plays a key role in iron metabolism exerting the dual functions of iron detoxification and iron reserve. Ferritin shows a highly conserved 3-D structure and is made up of 24 sub-units (H and L) arranged to give a hollow shell capable of storing some thousands Fe(III) atoms per molecule as inorganic complex.
Plasma concentration of ferritin varies greatly in different clinical conditions from a few micrograms/L up to 10 milligrams/L. Very high values are especially found in inflammatory and neoplastic diseases; high values are also found in patients undergoing chronic haemodialysis treatment.
Although ferritin may store up to almost 5000 atoms of iron per molecule, literature data indicate that in some clinical conditions the iron content of ferritin is much lower, with only some tens or hundreds atoms/molecule.
In the present study we used a modification of the method of Yamanishi et al. (Clin. Biochem. 35: 523-9, 2002) for measuring the iron specific content of ferritin in a group of patients in chronic haemodialysis treatment and in a group of healthy blood donors.
The iron content of ferritin (μmoles iron/mg ferritin) in the group of dialysisi patients seems to be lower than that of control group (median values: 10 vs. 26 μmoles/mg; $p<0.01$); furthermore, it seems to be inversely correlated to the concentration of plasma ferritin. Moreover, iron content of ferritin in some cases was found much higher than the maximum value usually quoted in the literature. The lower content of ferritin iron found in haemodialysis patients together with its inverse relation with the ferritin plasma concentration can be related to a change of the percent composition of H and L sub-units in the molecule
These results can throw new light on the significance of the increase of plasma ferritin found also in non-inflammatory clinical conditions.

109

VERIFICA DELLA FLOW CHART PER LO SCREENING DELLE TALASSEMIE.

D'Eri N., Greco G., Ciola P., Vinci E.

U.O.Patologia Clinica P.O. di Ostuni-Fasano; A.U.S.L. BR/1.

Scopo del lavoro: una verifica della flow chart per lo screening delle talassemie da noi utilizzata, sulla base dei dati della attività svolta negli ultimi due anni su utenti afferenti ai nostri laboratori tra cui viene registrata una sempre crescente utenza extra-comunitaria.
Metodologia: determinazione delle indagini di Primo livello (indici eritrocitari tramite l'impiego di analizzatore automatico Technicon H3 RTX della Bayer e pattern dell'Hb tramite HPLC a scambio cationico - Variant della BIO RAD).
Risultati: Sul totale di 1285 pazienti studiati, di cui 50 extra-comunitari, sono risultati Normali (MCV > 78fL, MCH > 27 pg, HbA2 < 3,2 %) 821 soggetti; β - Thalassemia Carrier (MCV < 78 fL, MCH < 27 pg, HbA2 > 3,2 %, HbF 0,1 – 7 %) 179 soggetti; 205 pazienti sono risultati avere MCV < 78 fL, MCH < 27 pg, HbA2 < 3,2 % e inquadrati nel gruppo delle anemie ipocromiche sideropeniche, α – Thalassemia carrier, δ– β – Thalassemia o β – Thalassemia con HbA2 normale);
14 pazienti, poi, sono risultati avere MCV < 78 fL, MCH < 27 pg, HbA2 < 3,0 % e HbF (2 – 16 %) ed inquadrati come β– Thalassemia o come HPFH (persistenza di emoglobina fetale); inoltre da segnalare che ben 55 soggetti avevano dei valori HbA2 borderline (HbA2 : 3,2 – 3.5 %) e di questi ultimi 29 con MCV > 78 fL, e 26 con MCV < 78 fL ; 3 casi presentavano indici eritrocitari normali e HbA2 > 3,5 % e 8 casi con HbF aumentata (2 – 35 %) e con indici eritrocitari vari.
Discussione e Conclusioni: Il riscontro di numerosi casi con valori di HbA2 borderline (sospetta β – Thalassemia silente), di aumento isolato di HbA2, sospetta α – Thalassemia con corpi inclusi eritrocitari negativi, aumento di HbF isolata e Varie Varianti Emoglobiniche, cosi' come l'aumento, sempre maggiore, di casi di pazienti extra - comunitari con pattern Hb diversi, impone l'utilizzo di indagini di Secondo e Terzo livello: Studio della sintesi delle catene globiniche con HPLC, RP – HPLC per lo studio strutturale dei polipeptidi e analisi degli aminoacidi e accurata indagine genotipica; tutto cio' al fine di realizzare una prevenzione sempre piu' capillare delle sindromi talassemiche e delle diverse emoglobinopatie.
Riferimento Bibliografico:
Traeger-Synodinos J., Old J.M., Petrou M., Galanello R.
Best Practice Guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies, EMQN meeting 2002.

110

VARIABILITA' BIOLOGICA INTRA ED INTER-INDIVIDUALE DELLA VELOCITA' DI ERITROSEDIMENTAZIONE

D'Altoe' P., Temporin V., Piva E., Buttarello M., Sanzari M., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Italia

Scopo dello studio: La variabilità biologica è stata indagata e studiata per molti costituenti in chimica clinica. Anche se numericamente inferiori, non mancano studi nell'ambito ematologico che hanno indagato la variabilità biologica intra-individuale nel breve, medio e lungo termine per gli otto parametri essenziali dell'emocromo, i reticolociti, gli indici derivati, ma anche la concentrazione del fibrinogeno, mentre in letteratura solo due studi sono stati applicati alla velocità di eritrosedimentazione. Ciò è dovuto al fatto che la VES non è paragonabile ad un costituente biochimico, ma è un fenomeno fisico, valutato in termini di velocità, più appropriatamente come lunghezza, non replicabile, né conservabile come un analita in matrice di plasma o siero. Materiali e Metodi Lo studio è stato condotto con 23 soggetti volontari sani (13 femmine, 10 maschi), di età compresa tra i 23 ed i 55 anni, con valore medio di ematocrito di 39 per le femmine e 45 per i maschi, in condizioni di standardizzazione per il reclutamento ed il prelievo. I campioni di sangue sono stati prelevati in provetta Vacutainer (Becton Dickinson, Milano) anticoagulata con K2EDTA. Per le femmine è stato valutato la ciclicità del mestruo. La VES è stata eseguita con l'analizzatore TEST1 (SIRE Analytical Systems, Udine), sistema automatico per la determinazione della velocità di eritrosedimentazione la cui tecnologia è basata sulla fotometria capillare quantitativa. Lo schema dello studio è stato condotto con prelievi seriati per la valutazione della variabilità intra-die (giorno), a breve termine (settimana) ed a lungo termine (sei mesi). Lo studio è stato eseguito con replicati e per l'analisi statistica è stata applicata l'ANOVA a due vie con replicati. Risultati E'stata riscontrata una differenza significativa tra i due sessi. I valori di CVi e CVg sono:

	CVi (%)		**CVg (%)**	
	Femmine	Maschi	Femmine	Maschi
giorno	12,09	14,04	80,2	89,22
settimana	15,15	35,83	65,72	79,06
Sei mesi	46,08	45,51	63,53	95,37

Conclusioni. L'applicazione dello studio ha permesso di calcolare i traguardi analitici, la differenza critica e l'indice di individualità.

	Differenza critica	Indice di individualità	Indice di eterogeneità
F	37	0,15	12,85
M	58	0,16	20,89

I risultati riconfermano la differenza significativa tra i due sessi e che la variabilità biologica intra-individuale è maggiore a lungo che a breve termine. Nelle femmine, la variazione è maggiore in coincidenza del mestruo.

111

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF RETICULATED PLATELETS:A RAPID-SENSITIVE TEST TO EVALUATE THROMBOCYTOPENIC DISORDERS AND THROMBOCYTOPOIESIS.

Salvagno G.L.(1), Degan M.(3), Ricetti M.M. (2), Marradi P.L , Montesi G.(3), Riolfi P (3), Poli G.(1), Lechi C.(1), Minuz P.(3), Guidi GC

(1). Dipartimenti di (1) Scienze Morfologico-Biomediche (2) Medicina Clinica e Sperimentale (3) Scienze Biomediche e Chirurgiche.

Reticulated platelets (RP) with high ribonucleic acid (RNA) content, considered as newly produced cells, are useful to evaluate thrombopoiesis and platelet turnover. The measure of RP allows to distinguish between a thrombocytopenia caused by impaired platelet production and that due to increased platelet destruction. Moreover RP are a sensitive and specific test for evaluating thrombocytopoiesis after chemotherapy. In the last years flow cytometric detection with thiazole orange (TO), a fluorescent nucleic acid dye which crosses platelets membrane and binds intracellular RNA, has been used. Venous blood anticoagulated with K_2EDTA was incubated for 15 min at 22°C in the dark with monoclonal antibody which recognize GPIIIa on platelet membrane (CD61PE Immunotech) and with TO (0.6μg/mL, final concentration). The cells were then fixed with 1% paraformaldehyde. Samples were analysed with Beckman Coulter Elite flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser. The main problem in the analysis of TO-stained platelets is the definition of a threshold gate for positivity. Live gating on platelet-sized event was performed using the distinctive forward - vs. side scattering profile of platelets. Verification of the platelet gate was performed on each sample by incubating blood with a saturating concentration of CD61 and its isotype control. The platelet gate was adjusted so that > 95% of events were GPIIIa-positive. The percentage of RP from 20 blood healthy controls was investigated. The mean percentage of RP in our control group was 5.78 ± 2.92. In the group of patients with haematologic malignancy the mean percentage of RP during marrow regeneration was 13.9 ± 9.9. A significant increase of of RP was observed at about 15 days after induced aplasia. In 5 children with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) the percentage TO positive platelets was 50.9 ±13.8 8 ($p<0.001$ versus control subjects). In patients with hepatic cirrhosis and thrombocytopenia we also observed an increase of TO stained platelets.. The measurements of TO positive platelets could predict the spontaneous rise of the platelets in the peripheral blood after chemotherapy and can be useful in the diagnosis of ITP and other thrombocytopenic conditions.

1) Kienast J, Schmitz G. Blood. 1990;75(1):116-21.

112

LA CONTA MONOCITARIA: VALUTAZIONE DI TRE ANALIZZATORI EMATOLOGICI VS CITOFLUORIMETRIA E CITOCHIMICA.

La Gioia A., Chiapponi I., Fiorini M., Matteucci A., Petricci P., Russo G., Balagi S., Batistoni A., Fedi S., Ghinami F., Hurle C.,Manzin A., Sabatini M..

U.O. Patologia Clinica. Azienda USL 6Livorno.

I diversi parametri dell'esame emocromocitometrico e del conteggio differenziale leucocitario, generalmente presentano buone correlazioni utilizzando i normali analizzatori ematologici automatici. Tuttavia per alcuni parametri la correlazione è meno buona in relazione alle diverse tecnologie utilizzate per il conteggio. Tale è ad esempio il caso delle conta dei granulociti basofili e dei monociti. Il presente studio si propone di valutare il comportamento di tre diversi analizzatori ematologici confrontandone le prestazioni con il conteggio delle cellule positive alla citochimica specifica α-naftil-butirrato-esterasi e con la citometria di flusso con anticorpi monoclonali CD45/CD14. Abbiamo utilizzato i seguenti analizzatori Beckman Coulter LH 7500, Bayer Advia 120, Dasit Sysmex XE 2100. Becton Dickinson FACScan si avvale di una combinazione di CD45 FITC e CD14 PE, al meglio dei 10.000 eventi, considerando come riconoscimento monocitario la doppia positività CD45/CD14 su gate SSC/CD45. La conta al microscopio ottico (x 200 leucociti) utilizzando la colorazione citochimica della α-naftil-butirrato-esterasi è stata condotta da due operatori distinti in cieco. Sono stati testati 100 campioni, privi di interferenze, selezionati dalla routine giornaliera. Lo studio comparativo ha evidenziato un eccellente accordo tra le misurazioni di LH 750 e le metodiche di riferimento ed un valore accettabile per XE 2100 e Advia 120 con un bias maggiore per quest'ultimo.

	LH750	XE2100	Advia 120	FACScan	Est.
Media	9.57	5.53	5.49	9.11	7.35
DS	7.20	4.18	4.31	6.8	5.21

	LH750 vs FACScan	XE 2100 vs FACScan	Advia 120 vs FACScan
Bland Altman			
Bias	0.4555	3.589	3.622
ds bias	1.442	2.906	3.376
IC 95%	-2.372-3.282	-9.284-2.107	-10.238-2.995
ANOVA- Newman Keuls			
P	>0.05	<0.01	<0.01
Pearson			
R	0.980	0.971	0.911
Intercetta	0.1040	0.0759	0.2286
Pendenza	1.03856	0.5979	0.5775

Successivamente modificazioni dei fattore di correzione post-calibrazione dell'analizzatore Sysmex XE 2100 ne hanno consentito un riallineamento delle prestazioni.

Bland Altman	XE 2100 vs LH 7500
Bias	-0.306
ds bias	1.655
IC 95%	-3.551-2.939

113

CONTEGGIO DEI PROGENITORI EMOPOIETICI CD34+ SU SANGUE CORDONALE: ANALISI IN CITOFLUORIMETRIA (FCM) E PARAMETRO HPC DELL'ANALIZZATORE SYSMEX XE-2100

Valentini M.; Catenacci R.; Frasca L.; Bettini R.; Sbrozzi D.; *Marabini A.; Rinaldi G..

Laboratorio analisi chimico cliniche e microbiologiche; *U.O. Ostetricia e Ginecologia; AO "Ospedale San Salvatore", Pesaro

SCOPO DEL LAVORO: Valutazione dell'utilità del parametro HPC (Human Progenitor Cell) misurato dall'analizzatore Sysmex XE-2100 (Sysmex Corporation) rispetto al conteggio CD34+ in FCM nella quantificazione delle cellule staminali emopoietiche su sangue cordonale, per una efficace identificazione delle unità idonee ai fini terapeutici.
MATERIALI E METODI: Sono stati analizzati 36 campioni di sangue cordonale per il conteggio di cellule CD34+ in FCM (protocollo ISHAGE, dual platform, citofluorimetro Beckman Coulter EPICS XL) e il conteggio HPC con sistema Sysmex XE-2100. Le analisi sono state eseguite entro 2-12 ore dalla raccolta dei campioni. La valutazione statistica dei dati è stata effettuata con software Analyse-it (vers. 1.71).
RISULTATI: La distribuzione dei valori ottenuti sui 36 campioni analizzati è riassunta in Tabella 1. I valori di HPC sono inferiori al conteggio CD34+ in FCM, mentre il range di dispersione dei valori (5° - 95° percentile) è sovrapponibile.

Tabella 1	CD 34 (x 10^6/L)	HPC (x 10^6/L)
Mediana	30,000	19,000
Range	7,100-89,550	0,510-70,000

La correlazione tra i due metodi è statisticamente significativa, $p<0.050$, con valore di $r=0.420$. Per valutare la sensibilità e la specificità del conteggio HPC è stato eseguito studio delle curve ROC a due livelli di conteggio CD34+ in FCM: 10,0 x 10^6/L e 20,0 x 10^6/L. L'analisi dimostra che utilizzando cut-off di HPC > 2,0 x 10^6/L nel primo caso e ≥ 8 x 10^6/L nel secondo caso si ottengono le seguenti perfomance diagnostiche:

	Sensibilità	Specificità
HPC>2,0 e CD34>10	91,2%	100,0%
HPC>8,0 e CD34>20	92,3%	70,0%

CONCLUSIONI: I risultati del nostro studio (tuttora in corso) evidenziano che il conteggio HPC eseguito da Sysmex XE-2100 consente una efficace misura del potenziale emopoietico del sangue cordonale e può essere un utile metodo di screening nei criteri di selezione dei campioni validi per il banking. In tal modo si può risparmiare tempo, risorse ed economicità riservando l'analisi CD34 in citofluorimetria solo ai campioni con effettiva utilità terapeutica. I vantaggi di tale percorso analitico consistono nella rapidità, economicità e completa automazione, prima di procedere ad un più accurato conteggio delle CD34 in citofluorimetria a flusso.
BIBLIOGRAFIA
Monitoring Hematopoietic Stem and Progenitor Cells with Sysmex Automated Hematology Analyzers - Fu-Sheng Wang et al. – Laboratory Hematology 8:119-125

114

PLATELET FUNCTION IN GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE

1a. Pavan C.(2), Olivieri O.(2), Salvagno G.L.(1), Poli G.(1), Tommasoli RM(1),Degan M (3) Lechi C.(1), Minuz P.(3), Guidi GC.(1).

Dipartimenti di (1) Scienze Morfologico-Biomediche (2) Medicina Clinica e Sperimentale (3) Scienze Biomediche e Chirurgiche.

Glycogen storage disease type 1 (GSD-1), also known as von Gierke disease, is a group of autosomal recessive metabolic disorders caused by deficiencies in the activity of the glucose-6-phosphatase (G6Pase) system that consists of at least two membrane proteins, glucose-6-phosphate transporter (G6PT) and G6Pase.These enzymes work in concert to maintain glucose homeostasis. Glycogen storage disease type 1 a (GSD-1) is caused by a deficiency of glucose – 6-phosphatase.
In this report we consider a 19 years old girl with glycogenosis 1a : the analysis of G6Pase revealed a G T transversion at nucleotide 727 (727 G→ T). The patient presented a bleeding diathesis, carachterized by prolonged bleeding time, defective platelet aggregation, a normal platelet count and mild reduction of von Willebrand factor.
Methods : the rate of platelet aggregation, measured as the change in percentage of transmitted light, was monitored for 3 minutes after the addition of the agonists by using a 4-channel aggregometer. Aggregation was studied in PRP and in suspensions of washed platelets (0.5 mL, $2x10^8$ cells/mL).The cells , maintained in the aggregometer at 37°C for 1 minute in HEPES buffer in the presence of 1 mmol/L $CaCl_2$ and 1 mmol/L $MgSO_4$, with continuous stirring , were then stimulated with ADP, U46619 , arachidonic acid and thrombin. 5 and 10 µmol/L ADP-induced aggregation was significantly reduced : 2,4±1,69, 10± 4.1 versus control subject 50±22,4 and 63,2±9,7 (Mean± ES). U46619 induced aggregation was also reduced , but the reduction was lower than with ADP. On the contrary, thrombin induced aggregation was similar in the patient and control. These results are similar in PRP and in washed platelets. Arachidonic–induced aggregation was reduced only in PRP,and normal in washed platelets. Finally, reduction of ADP-aggregation was removed by adding U46619 0.1,1, 2µmol/L indicating the cooperativity of ADP and U46619. Moreover a reduction in washed - platelet adhesion to fibrinogen-coated microwells induced by U46619 (50,100,1000 nmol/L) and thrombin (0.05 u/mL,0.1 u/mL)was also observed versus control subjects, while ADP induced –adhesion was normal.
The present data confirm previous reports of bleeding diathesis in patients with glycogen storage disease type1a. The alterations in this patient are difficult to interpret ; they could depend on a concomitant severe hyperlipemia present in the girl, but could also depend on a specific defect of the platelet response to ADP (aspirin-like syndrome, ADP receptor alteration ?) and TXA2. Further studies on platelet secretion and on fibrinogen binding agonist- induced are necessary to clarify the problem.

115

IL CONTEGGIO DEGLI ERITROBLASTI NEI NEONATI QUALE INDICE DI SOFFERENZA PERINATALE: VALUTAZIONE SU XE2100.

Temporin V., Piva E., Buttarello M., Lauri F., Molesini L., Plebani M.

Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Padova
Dipartimento di Scienza Ginecologiche e della riproduzione umana, Università degli Studi, Padova

Introduzione
Da numerosi studi è noto come la presenza di eritroblasti nel sangue dei neonati e dei prematuri rappresenta una condizione associata ad asfissia in epoca perinatale: la conseguenza più grave è il danno cerebrale che può avere un'influenza importante sulla sopravvivenza e la qualità di vita del bambino. In questo studio abbiamo valutato negli stati di sofferenza fetale sia acuta che cronica la sensibilità e la specificità del conteggio degli eritroblasti nel sangue funicolare rispetto gli altri parametri clinici ed ematochimici già utilizzati.
Materiale e metodi
Dal gennaio al dicembre 2003 sono stati analizzati 97 campioni di sangue funicolare ottenuti da neonati le cui madri erano state precedentemente valutate nelle due settimane antecedenti il parto mediante rilievi ecografici ed emodinamici (flussimetria Doppler) e durante il travaglio con cardiotocografia. I neonati in base ai dati strumentali, ematochimici (pH e emogasanalisi) e il valore dell'Apgar alla nascita sono stati suddivisi in tre gruppi: 34 in sofferenza cronica, 8 in sofferenza acuta e 48 sono stati i casi di controllo (neonati senza sofferenza). Il conteggio degli eritroblasti è stato ottenuto con lo strumento ematologico di recente introduzione XE 2100 (Sysmex Corporation, Kolbe, Japan) che utilizza un canale dedicato: gli eritroblasti vengono identificati mediante l'utilizzo di un colorante fluorescente che si lega al DNA e misure dimensionali (foward scatter).
Risultati
Confrontando l'emogasanalisi con i valori di eritroblasti si è riscontrata una relazione inversa con i valori di pH e BE; l'acidosi fetale e valori negativi BE correlano in maniera inversa al conteggio degli eritrobalsti. Dall'analisi delle curve ROC è emerso come in corso di sofferenza cronica fetale il numero di eritroblasti sia maggiore rispetto sia allo stato di sofferenza acuta che ai controlli.
Conclusioni
I dati che abbiamo ottenuto sono in accordo con altri studi: il numero di eritroblasti correla ad intensità e durata dello stato ipossico e quindi sono in grado di dare informazioni sull'epoca della sua insorgenza.
Il conteggio degli eritroblasti data la sua semplicità di esecuzione ed al basso costoso rappresenta un valido marker di ipossia neonatale.

116

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER LE ANEMIE EMOLITICHE DA DIFETTO CONGENITO DELLE PROTEINE DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA

Caprari P., Tarzia A., Caforio M.P., Salvati A.M

Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Reparto di Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, Istituto Superiore di Sanità - Roma

La sferocitosi (HS) e l'ellissocitosi (HE) ereditarie sono anemie emolitiche determinate da un difetto congenito delle proteine della membrana eritrocitaria. Il quadro clinico è molto eterogeneo, dal portatore asintomatico all'emolisi cronica grave trasfusione-dipendente. La sintomatologia è spesso più grave nel periodo neonatale. In questo lavoro viene presentato un protocollo per la diagnosi di anemia emolitica da difetto congenito della membrana eritrocitaria che si articola su tre livelli di indagine: **I° livello** test di screening di anemia emolitica comprendenti indici eritrocitari, striscio di sangue periferico, reticolociti, bilirubina, aptoglobina, LDH e test di Coombs; **II° livello**: test di lisi al glicerolo acidificato ($AGLT_{50}$), morfologia eritrocitaria e dosaggio degli enzimi eritrocitari glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), piruvato chinasi (PK) ed esochinasi (HK) e dei metaboliti intermedi ATP e GSH; **III° livello** analisi elettroforetica in SDS-PAGE delle proteine di membrana e analisi dell'equilibrio di associazione della spettrina in dimeri e tetrameri.
Il protocollo è stato valutato su 106 pazienti, 58 maschi e 48 femmine, esaminati negli anni 2001-2003. Ai test di screening di **I° livello**, effettuati presso 8 Centri di Ematologia e Pediatria, i pazienti presentavano: iperbilirubinemia (43%), anemia (35%), reticolocitosi (41%), aumento RDW (37%), anomalie morfologiche (23%), splenomegalia (10%). I Centri richiedevano un approfondimento diagnostico (**II° e III° livello)** presso il nostro laboratorio con le seguenti motivazioni: conferma diagnosi (35%), anemia emolitica ndd (27%), iperbilirubinemia (23%) e studio familiare (17%). Le richieste di indagine comprendevano: dosaggio enzimi eritrocitari (PK, HK) ed analisi delle proteine di membrana (47%), analisi delle proteine di membrana (43 %), dosaggio enzimi eritrocitari (10%).
Le indagini di **II° livello** dimostravano anomalie della morfologia eritrocitaria nel 77% dei casi, aumento di fragilità osmotica nel 68% dei casi e permettevano di individuare 3 casi con deficit di PK e 3 casi con deficit di G6PD. Le attività PK e HK risultavano spesso aumentate (45%), in particolare nei pazienti con microcitemia e reticolocitosi. Le indagini di **III° livello** permettevano di individuare anomalie delle principali proteine della membrana: spettrina, proteina banda 3, proteina 4.2, proteina 4.1 e anchirina.
L'applicazione del protocollo ha permesso di diagnosticare 29 casi di HS, 23 di HE, 10 con associazione HS-HE, 4 di ovalocitosi, 7 con acantocitosi ed un caso di associazione del deficit di G6PD con HS.

117

CORRELATION BETWEEN THE IRON CONTENT OF PLASMA FERRITIN AND THE OXIDATIVE METABOLIC ACTIVITY OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

°De Sole P., °Rossi C., °Scatena R., *Spada P., *Schiavone R., *Vulpio C.

°Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica - *Istituto di Clinica Chirurgica, Università Cattolica del Sacro Cuore –Roma

Ferritin, a 500 kdaltons protein with the function of iron detoxification and iron storage, is mainly present in the cellular compartment with only a small fraction in plasma. However, its plasma concentration can varies greatly in different clinical conditions as iron deficiency anaemia, iron load, inflammatory conditions and neoplastic diseases.
In a companion poster (Scatena et al.), we show that the concentration of plasma ferritin of a group of patients undergoing chronic haemodialysis is higher than that found in a control group; moreover, the iron content of ferritin was found inversely related to the ferritin concentration.
Because ferritin has an important regulatory function of iron metabolism, in the present poster we make the hypothesis of a possible correlation between the actual iron content of ferritin and the function of cells, like polymorphonuclear (PMN) leukocytes, highly committed towards intense oxidative metabolic activities (oxidative burst).
The iron specific content of ferritin was measured using a modification of the method of Yamanishi et al. (Clin. Biochem. 35: 523-9, 2002) as reported in the companion poster (Scatena et al.); the oxidative metabolic activity of PMN leukocytes was measured using 0.5 μl of blood in a chemiluminescence test according to the method of De Sole et al. (J Biolumin Chemilumin 8: 153-8, 1993).
Preliminary results indicate that while the iron content of ferritin of patients undergoing chronic haemodialysis is positively correlated with the chemiluminescence of PMN leukocytes, no correlation was found with the PMN leukocytes of control subjects. This result seems to strengthen the hypothesis of the role of ferritin as a regulatory protein of iron metabolism in many cellular states. Therefore, the high values of plasma ferritin that sometimes are found also in non-inflammatory conditions should be considered not only as a marker of increased iron storage.

118

MIELOPEROSSIDASI (MPO) E INDICE MEDIO DI PEROSSIDAZIONE (MPXI) NEI DISORDINI AUTOIMMUNI DELLA TIROIDE

Gioia M., Polizzotto A., Cannella P., Cillari E.

U.O. Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera V. Cervello

La mieloperossidasi (MPO), enzima presente nei granuli azzurrofili dei neutrofili, è coinvolta nella difesa contro i patogeni attraverso la produzione di acido ipocloroso (HOCl) , dotato di potente azione ossidante. I prodotti di reazione (MPO-H_2O_2-Cl) hanno attività contro virus, batteri, funghi ed esercitano alcune funzioni tumoricide. Oltre alla implicazione della MPO come marker dei precursori mieloidi delle leucemie mieloidi acute, questa proteina è stata studiata per via della sua deficienza nei pazienti affetti da infezioni gravi. Grazie allo sviluppo di nuovi analizzatori ematologici automatici è stato possibile determinare facilmente le deficienze di MPO utilizzando l'indice medio di attività perossidasica (MPXI) e si è così potuto dimostrare che il deficit è molto più comune del previsto e non è associato ad una maggiore suscettibilità a sviluppare infezioni, eccetto che nei pazienti con diabete mellito. Il deficit di MPO può essere congenito, o acquisito Si è rilevato che la molecola di MPO presenta epitomi cross-reattivi con la perossidasi tiroidea (TPO) e autoanticorpi anti-TPO(aTPO) reagiscono anche con MPO, legando porzioni fuori dalla regione immunodominante. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare lo MPXI, tramite strumento ADVIA 120 (Bayer, Diagnostici, Milano) in 18 pazienti affetti da patologia autoimmune tiroidea (12 dei quali presentavano anticorpi aTPO) ed in 7 pazienti affetti da gozzo non su base autoimmune. L'indice MPXI normale viene espresso con valori tra +7 a –7 ed indica l'attività media MPO. Dei 12 pazienti positivi per anticorpi aTPO 4 di loro (33%) presentavano valori patologici di MPXI (-2,2+/- 4, indicanti un deficit dell'enzima all'interno dei neutrofili), dei 6 pazienti negativi per anticorpi aTPO 3 (50%) aveva MPXI patologico. Solo un paziente dei 7 con gozzo non autoimmune (14,8%) aveva valori anormali di MPXI (-17.1).
La bassa associazione tra riduzione di MPXI e anticorpi aTPO conferma che la cross-reattività tra MPO e TPO non è significativa. Comunque esiste una associazione significativa ($P<0.05$) tra patologia autoimmune tiroidea e riduzione di MPXI, rispetto a quanto osservato nella patologia tiroidea non autoimmune (rispettivamente 55.5% vs 14.8%). Questo studio preliminare suggerisce di valutare, in un più ampio campione, se MPXI abbia valore ai fini del decorso delle patologie tiroidee e se sia possibile dare a tale parametro valore di test diagnostico e prognostico di rilievo nella patologia tiroidea.
Bibliografia. Hoy. Et al. Growing significance of myeloperossidase in non-infectious disease. Clin. Chem. Lab. Med. 40: 2-8, 2002-

119

Hb Moscva (&beta24(B6)Gly--&gtAsp): NUOVE OSSERVAZIONI IN UNA FAMIGLIA ECUADORIANA.

Brunati P.; Colzani C.; Restagno G.; Leone L.; Collell M.; Palisi A.; Murtas R.; Mediate D.; Monteleone M.; Mangione M.;

A.O. OIRM-S.Anna, Torino

Nel 1974, Idelson e coll.(1) descrissero in una famiglia russa i primi tre casi di eterozigosi per Hb Moscva. A distanza di 30 anni non sono state pubblicate altre segnalazioni.
Lo scorso giugno, è giunto al nostro laboratorio (Torino) proveniente dal laboratorio analisi dell'Ospedale Valduce (Como) un campione di una paziente ecuadoriana con una modesta anemia microcitica. La separazione cromatografica mediante HPLC aveva evidenziato una emoglobina anomala che veniva separata prima dell'HbA, in quantità di 22.0 %.
A Torino, nello studio degli esami di II livello , si evidenziavano i seguenti risultati:
- l'elettroforesi, mostrava a pH alcalino una banda veloce di tipo HbJ, e a pH acido una banda in HbA;
- la separazione delle catene globiniche la presenza di catene varianti di tipo beta in posizione D ;
- l'analisi molecolare mediante Sequenza diretta ha evidenziato la mutazione GGT > GAT al codone 24 del gene della beta globina in eterozigosi, identificando quindi la variante &beta24 (B6) Gly--&gtAsp come corrispondente al fenotipo Hb Moscva.
Gli accertamenti eseguiti sui membri della famiglia della paziente residente in Italia (una sorella ed un fratello) mostravano la presenza della stessa emoglobina anomala (20.7%) solo nella sorella .
In bibliografia la percentuale di variante nell'eterozigote non è nota visto la scarsità dei casi. In questo studio tale percentuale di Hb Moscva è di circa il 21 -22 %, mentre nel 1974 Idelson rilevò una percentuale del 17 % nei tre casi descritti. Si può concludere che la percentuale di Hb Moscva nell'eterozigote sarebbe di circa il 20 %.
E' in corso uno studio per determinare la stabilità dell'Hb e l'affinità per l'O2.

(1) Idelson, L.I., Didkowsky, N.A., Casey, R., Lorkin, P.A., Lehmann, H.: Nature, 249:768-770, 1974.

120

VALUTAZIONE DEI RECETTORI DEI MINERALCORTICOIDI A LIVELLO DEGLI SPERMATOZOI UMANI MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA E RADIORECEPTORASSAY.

Fiore C.; Masiero S.; Sartorato P.; Mattarello MJ.; Karbowiak I.*; Bonanni G.; Armanini D.

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche – Endocrinologia, Università di Padova, Padova.
*Laboratorio di Analisi, Ospedale Piove di Sacco, Padova

L'aldosterone agisce unendosi al suo recettore non solo a livello dei classici tessuti bersaglio (rene, intestino, ghiandole salivari, etc.) ma anche a livello di altri tessuti non epiteliali (ippocampo, endotelio dei vasi, globuli bianchi, etc.).
In tali tessuti l'aldosterone sembra anche produrre un effetto pro-ossidante, che tra l'altro è responsabile delle complicanze cardiovascolari nell'iperaldosteronismo. Lo stress ossidativo a livello dello spermatozoo sembra generare alterazioni a vari livelli che si riflettono soprattutto sulla motilità.
Scopo della nostra ricerca è stato quello di valutare la presenza di recettori dei mineralcorticoidi (MR) a livello dello spermatozoo umano e l'azione dell'aldosterone in tali cellule.
Abbiamo analizzato sei campioni di liquido seminale provenienti da sei soggetti sani, di età compresa tra i 25 e i 35 anni. Gli spermatozoi sono stati isolati sia mediante la tecnica dello swim-up da strato, sia mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Percoll.
Per la rilevazione citofluorimetrica dei recettori dell'aldosterone abbiamo utilizzato un anticorpo specifico anti-recettore dell'aldosterone, ottenuto nel coniglio, (anticorpo policlonale diretto contro una sequenza peptidica dedotta dalla regione N-terminale immunogenica del recettore dell'aldosterone umano clonato), e un anticorpo fluorescente secondario (antiimmunoglobuline di coniglio) diretto contro l'anticorpo primario. Parte degli spermatozi è pre-trattata con metanolo, per permeabilizzarne la membrana.
Gli esperimenti di radioreceptorassay sono stati fatti isolando gli spermatozoi con le tecnica sopra citate ed incubandone (per 1 h a 37°C), un'aliquota con aldosterone marcato a dosi decrescenti, da solo o con aggiunta di un eccesso di aldosterone freddo. In tutti i campioni è stato aggiunto un glucocorticoide puro per escludere il legame dell'aldosterone al recettore dei glucocorticoidi. Dopo l'incubazione sono stati eseguiti tre lavaggi e la loro radioattività è stata misurata con β-counter. I risultati sono stati espressi mediante analisi Scatchard.
Dai dati ottenuti con la citofluorimetria abbiamo rilevato che per quanto riguarda gli spermatozoi non

120

trattati con metanolo, è risultata solo una debole fluorescenza, sia negli spermatozoi incubati con anticorpo primario (anticorpo specifico antirecettore) e con anticorpo fluorescente secondario (anticorpo anti immunoglobuline di coniglio), sia negli spermatozoi incubati solamente con l'anticorpo secondario (fluorescenza del 27%). Per quanto riguarda gli spermatozoi pre-trattati con metanolo, è risultata una fluorescenza di alta intensità nel 98% degli spermatozoi incubati con anticorpo primario e secondario. I risultati dimostrano, dunque, che lo spermatozoo possiede i recettori dei mineralcorticoidi e che essi sono intracellulari, in quanto non sono evidenziati nel caso l'anticorpo primario non sia in grado di penetrare la membrana cellulare, come succede nel caso in cui le cellule abbiano la membrana intatta.
Dagli esperimenti di radioreceptorassay risulta che il valore medio di recettori dell'aldosterone per singolo spermatozoo è di 250±105 recettori per cellula e l'affinità 2.1±0.4 nmol/L.
Abbiamo inoltre incubato sia lo sperma intero che gli spermatozoi isolati con concentrazioni fisiologiche che sovra-fisiologiche di aldosterone. Tali studi purtroppo non hanno evidenziato alcun effetto dell'aldosterone sulla motilità spermatica. Una possibile spiegazione di tale risultato negativo potrebbe essere che, in realtà, anche dopo incubazione senza aldosterone la motilità era marcatamente ridotta. Tale situazione evidenzia che i vari passaggi di purificazione degli spermatozoi sono di per sé uno stress importante per tale cellula.

121

DETERMINAZIONE IMMUNOENZIMATICA DEL Δ4-ANDROSTENEDIONE SIERICO SU TRITURUS GRIFOLS: OTTIMIZZAZIONE DEL METODO

Carrozza C, Santini SA, Lulli P, Zagarella R, Maceratesi L, Dominici L, Serva P, Miano L*, Zuppi C.

Servizio di Analisi Ormomali e Biologia Molecolare Clinica, Policlinico "A. Gemelli",
*Grifols Italia.

Scopo del Lavoro: Abbiamo ottimizzato la metodica immunoenzimatica su micropiastra, automatizzata su Triturus® (Grifols) per la determinazione del Δ4-androstenedione sierico. Abbiamo correlato i risultati con quelli ottenuti con metodica immunoradiometrica (Immunotech).
Metodo: Abbiamo utilizzato il kit della Dia.Metra che prevede: il Δ4-androstenedione del campione, compete con quello marcato con perossidasi, nei confronti dell'anticorpo adsorbito su micropiastra. Dopo lavaggio della fase solida, l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con H_2O_2 ed il cromogeno, determina una variazione di colore inversamente proporzionale alla concentrazione dell'androstenedione del campione.
Per migliorare la performance analitica abbiamo apportato le seguenti modifiche alla metodica commerciale:
- Aumento del numero dei lavaggi con H_2O distillata (da 2 a 3).
- Aggiunta di un punto (2ng/ml) alla curva di calibrazione che risulta quindi eseguita alle seguenti concentrazioni: 0.1 0.4, 1.2, 2.0, 4.0 e 10.0 ng/ml.
- Elaborazione della curva nel formato logit-log
- Standardizzazione della procedura e dei tempi di esecuzione del test.
- Calcolo dei parametri per il monitoraggio dell'accuratezza e della precisione: abbiamo utilizzato come sieri di controllo Lyphocheck (Biorad) a tre livelli, non avendo il kit Dia.Metra controlli propri e non essendo riportati valori di riferimento Biorad per la metodica in immunoenzimatica su micropiastra.
Risultati: L'imprecisione analitica calcolata a tre livelli di concentrazione risultava:
CV intra-assay: 3.2, 2.5, 3.3 %
CV inter-assay: 6.1, 5.7, 3.4 %
rispettivamente per il livello basso, medio e alto
La correlazione dei risultati di 60 pazienti analizzati con la metodica ottimizzata con quelli ottenuti con la metodica RIA ha evidenziato un coefficiente di correlazione $R^2 = 0.83$, con una slope = 0.7.
Conclusioni: La metodica ottimizzata presenta i seguenti vantaggi, rispetto alla metodica RIA:
-riduzione delle fasi manuali del dosaggio
-riduzione dei tempi del dosaggio e facilità di esecuzione
-riduzione dei costi a parità di performance analitica considerata la buona correlazione con il metodo immunoradiometrico.

122

CROSS-SECTIONAL STUDY OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE METABOLISM IN PAEDIATRIC CANCER PATIENTS

[1]Ferrari L., [1]Seregni E., [1]Martinetti A., [1]Pallotti F., [1]Coliva A., [1]Filieri R., [2]Spreafico F., [3]Massimino M.

[1]Nuclear Medicine, [2]Radiology and [3]Paediatric Oncology Units, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milan, Italy

Aim. Therapeutic approaches for the treatment of oncologic paediatric patients can allow a long survival, but often alter the main endocrinological axes and cause a derangement in the physiological growth. In particular, bone remodelling may be influenced because it is controlled by several hormones. In this cross-sectional study we measured the main bone metabolism markers related both to bone formation [25-OH-vitamin D (25OH Vit D) and bone-specific alkaline phosphatase (BAP)] and resorption [intact parathormone (PTH) and carboxy-telopeptide of Type I procollagen (ICTP)] in children treated for paediatric tumours or in follow-up. **Materials and methods.** Serum samples were collected from 120 children (64 males and 56 females; median age 12 years for both males and females) with tumours localized in bone or in other sites (36 and 84 cases, respectively). The blood samples were collected in pre-chilled glass vials shielded from lights to avoid 25OH Vit D being photo-oxydized and PTH being hydrolysed. The analytes were measured by means of sensitive radioimmunoassays. Descriptive statistic was used to analyse the variable distribution into the studied population and the nonparametric Spearman Rank Correlation was used for the comparisons among the variables. **Results:**. 25OH Vit D levels below 12 ng/mL (deficiency in hormone production) were detected in 16/64 (30%) males and in 9/56 (16%) females. Insufficient 25OH Vit D content (12-20 ng/mL) was measured in 26/64 (41%) males and 30/56 (54%) females. According to the age class, high PTH levels were observed in 25/45 (56%) of males and in 20/39 (51%) of females with low 25OH Vit D serum content. Serum BAP and ICTP were increased in most of the children. The median values of all analytes did not differ between children with tumour at bone or other sites. Correlation analysis showed a week inverse relationship between 25OH Vit D and PTH (r=-0.209, p=0.0452). **Conclusions:** We concluded that most of the studied children had a deficiency in 25OH Vit D production. The demonstration that according to the age class half the children with low 25OH Vit D levels had high PTH levels should suggest to the oncologists a more accurate study of the endocrinological profile of the paediatric patients. The demonstration of increased BAP and ICTP levels suggests a bone metabolism activation. 25OH Vit D and intact PTH evaluation can give useful information in order to eventually avoid the onset of secondary hyperparathyroidism and bone remodelling disorders.

123

EFFETTI ENDOCRINI DELLA NUOVA PILLOLA CON DROSPIRENONE IN DONNE CON SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

*Bugari G., °Gambera A., *Franceschini R., *Busi D., *Caimi L., °Scagliola P., °Falsetti L., *Iacobello C.

*3° Laboratorio- Ormonologia, Spedali Civili Brescia
°Dip. Ginecologia Endocrinologica, Univ. di Brescia

La Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS) è l'endocrinopatia più frequente in età fertile ed è caratterizzata da anomala secrezione di gonadotropine, anovulazione cronica, iperandrogenismo e disturbi metabolici. Le manifestazioni cliniche più comuni sono: oligoamenorrea, seborrea-acne, irsutismo e alopecia. Tali manifestazioni sono legate all'iperandrogenismo e all'alterazione del sistema insulina/insulin-like growth factor-1 (IGF-1)/IGF-binding protein-1 (IGFBP-1) che promuovono l'attività mitotica e l'iperplasia del compartimento teco-stromale ovarico, potenziando la produzione di androgeni. L'uso dei contraccettivi orali di ultima generazione è indicato in queste pazienti per la capacità di sopprimere la secrezione di gonadotropine, androgeni ovarici e surrenalici, e di stimolare la sintesi epatica delle proteine vettrici. Il Drospirenone (DRSP) è un nuovo composto derivato dal 17α-spirolattone che combina una potente azione progestinica con una antiandrogenica e antimineralcorticoide con effetti simili al Progesterone naturale.
Metodi: LH, FSH, T (Vitros EcI, Ortho Clin. Diagnos., MI–Italia); SHBG, DHEAS, (Immulite 2000, Medical Systems GE –Italia); A, FT, 3□dG, IGFBP-1 (DSL, Diagnos. Syst. Lab., Inc. Webster; Texas-USA); IGF-1 (Liaison – Byk Gulden –Italia)
Lo scopo di questo studio è verificare le variazioni endocrine indotte nelle donne con PCOS (n=20) dalla nuova pillola monofasica contenete etinilestradiolo (EE) 30 μg e DRSP 3 mg, dopo 6 cicli di trattamento.

N=20	BASALE	6° CICLO
LH (mUI/ml)	11.5 ± 2.8	0.9 ± 0.3*
FSH (mUI/ml)	4.6 ± 0.7	2.3 ± 1.2*
A (ng/ml)	3.10 ± 0.67	1.40 ± 0.61*
T (ng/ml)	0.83 ± 0.13	0.37 ± 0.09*
FT (pg/ml)	2.79 ± 0.21	1.06 ± 0.20*
DHEAS (μg/ml)	3.1 ± 1.1	1.7 ± 0.8*
3αdG (ng/ml)	3.4 ± 1.6	1.0 ± 0.2*
SHBG (nMol/l)	29.1± 8.8	158.6 ± 27.8*
IGF-1 (ng/ml)	230.4 ± 40.4	118.0 ± 34.2*
IGFBP-1 (ng/ml)	31.5 ± 12.6	68.6 ± 28.3†

T Student dati appaiati: * P< 0.001 † P< 0.05 vs basali

La pillola EE/DRSP inibisce significativamente la secrezione di LH, FSH, la steroidogenesi ovarica e surrenalica (A, T, DHEAS). Grazie al marcato aumento di SHBG e IGFBP-1, riduce la quota libera ed attiva del T (FT) e delle IGF-1, producendo una significativa riduzione dell'attività dell'enzima 5α-reduttasi (calo 3αdG). Tale associazione contraccettiva può essere quindi un'alternativa nel trattamento delle donne con PCOS.

Hum Reprod 2001;16:36-42.

124

METODO ANALITICO E TIPO DI CAMPIONE INFLUENZANO SIGNIFICATIVAMENTE LA MISURA DEL PARATORMONE INTATTO?

°Bonfant G.; *Boggio-Lera G.; °Pellu V.; °Belfanti P.; *Sibille T.; *Navarretta R.; *Cristoferi M.

*Laboratorio Analisi, °Nefrologia, Ospedale di Aosta

Il dosaggio del paratormone intatto (I-PTH), importante marker del metabolismo osseo, presenta problemi nella confrontabilità dei risultati per la mancanza di uno standard internazionale universalmente accettato e per la diversa incidenza di reazioni crociate.
Scopi: verificare l'influenza di matrici differenti su due metodi immunometrici e confrontare gli stessi in gruppi di pazienti con I-PTH normale e patologico.
Sono stati esaminati i campioni di plasma di 52 pazienti suddivisi in tre gruppi (20 normali, 25 uremici, 7 con iperparatiroidismo primitivo) con i metodi Immulite (Medical Systems) ed Elecsys 2010 (Roche). Sono stati analizzati anche i sieri di 27 di questi pazienti (9 normali, 9 dializzati e 9 trapiantati). I campioni, prelevati contemporaneamente, sono stati conservati in bagno di ghiaccio, centrifugati a 4 °C entro 2 ore e conservati a -20 °C fino alla determinazione.
Immulite (IM) impiega un dosaggio immunometrico sequenziale a due siti, chemiluminescente, in fase solida; utilizza un anticorpo monoclonale murino contro la sequenza 44-84 e un policlonale di capra anti 1-34 coniugato con fosfatasi alcalina (ALP), range di misura 1-2500 pg/ml e valori di riferimento 10-69 pg/ml.
Elecsys 2010 (EL) impiega un dosaggio immunometrico a sandwich, elettrochemiluminescente, che utilizza un anticorpo monoclonale murino biotinilato anti 1-37 e un anticorpo monoclonale murino anti 38-84 marcato con un complesso di rutenio, range di misura 1,2-5000 pg/ml e valori di riferimento 15-65 pg/ml.
La regressione di Passing & Bablok, tra tutti i plasmi dosati con i due metodi, è EL = 0,46 + 0,75 IM, r =0,99. Le pendenze delle regressioni dei sottogruppi sono comprese tra 0,72 e 0,75.
Confronto tra matrici diverse (n=27):

Metodo	Plasma pg/ml Media (DS)	Siero pg/ml Media (DS)
Immulite	214 (292)	165 (212)
Elecsys	158 (212)	142 (195)

Il test t mostra una differenza altamente significativa solo tra plasma IM e plasma EL e tra plasma e siero IM.
La sovrapponibilità delle regressioni nei sottogruppi, per i campioni di plasma, fa ipotizzare che i metodi in esame non risentano in maniera diversa dell'influenza dei frammenti non 1-84, elevati nei pazienti uremici.
Su EL non sembra esserci un effetto matrice, mentre si può ipotizzare che un fattore plasmatico, non identificato, ma non corrispondente a frammenti non 1-84, interferendo sull'ALP, induca una sovrastima dei valori di PTH su IM. Su IM l'uso del siero, conservato correttamente, eviterebbe questo problema; d'altronde i valori di riferimento sono ricavati da campioni di siero.
Marangella M. et al: G Ital Nefrol 2002, 19 (4): 467-475

125

ORMONI MASCHILI IN FUMATORI E NON FUMATORI: STUDIO COMPARATIVO.

Cecere R., Solaro M., Pozzobon C., Basso L., Gerthoux P.M., Limonta G.

Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Ospedale di Desio, Desio (MI)

In letteratura sono presenti dati discordanti riguardo l'influenza del fumo di sigaretta sulle concentrazioni sieriche di ormoni sessuali. Alcuni studi imputano al fumo un effetto antiestrogenico, altri rilevano effetti sul metabolismo di altri ormoni sessuali, per esempio il testosterone.
Lo scopo di questo lavoro è stato valutare l'influenza del fumo di sigaretta sui valori di ormoni sessuali in una popolazione maschile apparentemente sana.
Sono state paragonate, in maschi partecipanti ad uno studio sulla fertilità, di età compresa tra 19 e 48 anni, le concentrazioni sieriche di deidroepiandosterone solfato (DHEAS), 17-beta estradiolo (E), testosterone (T), prolattina (P), LH, FSH e sex hormone-binding globulin (SHBG) nei fumatori e nei non fumatori.
Ogni partecipante ha risposto ad un questionario riguardante le abitudini di vita, la dieta, la storia medica ed occupazionale ed ha firmato un "consenso informato". Sono stati esclusi dallo studio i soggetti che dichiaravano patologie importanti, varicocele o ritenzione testicolare.
I 195 soggetti sono stati divisi in 2 gruppi: fumatori (n=60) e non fumatori (n=135). Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando SAS v 8.2 tenendo conto dei fattori di confondimento (età, Body Mass Index, alcool, esposizione a tossici).
I dati ottenuti indicano che la concentrazione di T è significativamente più alta (p=0.03) nel gruppo dei fumatori (media aggiustata 4.60 ng/mL, ES 0.17) rispetto a quello dei non fumatori (media aggiustata 4.17 ng/mL, ES 0.11). Il valore di P risulta invece più basso (p=0.05) (fumatori: media aggiustata 8.80 ng/mL, ES 0.44; non fumatori: media aggiustata 10.37 ng/mL, ES 0.33) .
Suddividendo i fumatori per quartili in base al numero di sigarette totali fumate, si evidenzia un aumento significativo (p=0.001) delle concentrazioni di DHEAS nel III-IV quartile (più di 64.000 sigarette) rispetto ai non fumatori (medie aggiustate 289.20 μg/dL, ES 19.60 e 222.76 μg/dL, ES 7.14 rispettivamente).
Tutti i risultati ottenuti, in entrambe le popolazioni, mostrano valori che si mantengono comunque all'interno del cosiddetto "intervallo di normalità".
Le concentrazioni degli altri ormoni sessuali considerati non mostrano differenze significative tra i due gruppi.
Questi dati concordano con diversi studi che hanno verificato l'influenza del fumo di sigaretta su valori ormonali maschili: in particolare un innalzamento della concentrazione del testosterone e DHEAS ed una diminuzione della prolattina.
Bibliografia. Trummer H. et al. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. Hum Reprod 2002; 17, 1554-9.

126

AGEING AND CARDIAC EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEINS: A POSSIBLE EFFECT OF DIETARY RESTRICTION.

Colotti C., Vitale R.L., Cavallini G., Del Ry S., Bergamini E., Giannessi D.

CNR Institute of Clinical Physiology and Research Centre of Biology and Pathology of Ageing Pisa Italy

Introduction: The heat shock response or stress response is associated to a rapid growth in the expression of a protein family named Heat Shock Proteins (HSPs). A reduction of the HSP production, particularly for Hsp72 in response to ischemic damage, is observed in the ageing. For this we evaluated the endogenous myocardial protection system as a function of ageing by evaluation of Hsp72, Hsc70, Hsp60 and Hsp27 expression in the heart in an experimental animal model. The effects of two different caloric restriction regimes, known to expand the longevity in rodents, were estimated too.
Methods: Tissue samples were obtained from right atrium (RA) and left ventricle (LV) of Sprague Dawley rats of different ages (n=5 for each group): 3 and 24 month old rats with free access to food (AL) and 24 month old rats maintained at caloric restriction of daily food intake to 60% of control value (DR) and every-other-day feeding (IF), respectively. HSPs were evaluated by quantitative Western Blotting analysis after tissue extraction and electrophoretic protein separation. HSP concentration was determined by interpolation of a dose-response curve, built in each gel, after image analysis by NIH-Image program. HSP mRNA expression was evaluated by RT-PCR analysis, with specific primers and β-actin as internal standard.
Results: In the myocardial tissue of young rats Hsc70 is the predominant protein both in the RA and in the LV (11.3 ± 0.4 and 6.9 ± 0. 3 μg/mg protein, respectively) followed by Hsp60 (3.7 ± 0.4 and 5.5 ± 0.1 μg/mg) whereas lower concentrations have been found for Hsp27 and Hsp72. In the 24 month old rats AL a significant reduction of the Hsc70, Hsp72 and Hsp60 levels was found with respect to the the young rats both in the RA and the LV (RA: 0.99 ± 0.18 vs 0.35 ± 0.07 μg/mg, $p = 0.0018$; 11.3 ± 0.4 vs 1.0 ± 0.2, $p<0.0001$; 3.7 ± 0.4 vs. 1.1 ± 0.2, $p<0.0001$, respectively, Fisher test after ANOVA). In all the 24 month old rats, irrespective of the dietary regimen, Hsp27 levels were below the sensitivity of the method. Hsc70, Hsp72 and Hsp60 levels in DR and IF 24 month old rats resulted increased if compared to AL ones. RT-PCR analysis confirmed the findings obtained at protein level.
Conclusions These results suggest that the ageing process is associated with a reduced expression of HSPs in myocardial tissue and that the two caloric restriction diets are able to regulate this effect, confirming their preconditioning role.
Reference: Soti C, Csermely P. Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilization diseases. Neurochem Intern 2002; 41: 383-389.

127

MODULAZIONE DELLA LEPTINA DA PARTE DEL BILANCIO TRA ANDROGENI E INSULINO-RESISTENZA NELLA PCOS

*Bugari G., °Gambera A., *Bonardi L., *Vitale A., *Caimi L., °Pagnoni S., °Scagliola P., *Iacobello C.

*3° Laboratorio- Ormonologia, Spedali Civili Brescia
°Dip. Ginecologia Endocrinologica, Univ. di Brescia

La Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS) è un disordine endocrino caratterizzato da alterata secrezione di gonadotropine, anovulazione, iperandrogenismo e una varietà di alterazioni metaboliche quali insulino-resistenza, iperinsulinemia, obesità e dislipidemia. Negli ultimi anni gli studi sulla leptina, ormone secreto dal tessuto adiposo, si sono intensificati per la notevole importanza delle funzioni che svolge nella regolazione dei circuiti endocrini centrali e nella modulazione dell'asse riproduttivo. Alcuni autori hanno recentemente ipotizzato che un anomalo comportamento della leptina potrebbe giocare un ruolo nello sviluppo o nel mantenimento della PCOS.
Lo scopo di questo studio è valutare il comportamento della leptina in un'ampia casistica di donne con PCOS (n=175) rispetto ad un omogeneo gruppo di controllo (n=156) stratificato per BMI ed indici metabolici. Inoltre, si intendono ricercare eventuali correlazioni tra leptina, androgeni, insulina ed insulino-resistenza.
Metodi: T(Vitros EcI, Ortho Clinical Diagnos., MI–Italia); I (Immulite 2000, Medica Systems GE –Italia); Leptina (DRG Tema Ricerca –BO –Italia); A, DHEA (DSL, Diagnos. Syst. Lab., Inc. Webster; Texas-USA).
Sia le PCOS normopeso che obese presentano livelli di leptina più bassi se paragonati ai rispettivi controlli (7.9 ± 3.5 vs 9.4 ± 4.3 ng/ml, $p<0.001$; 24.9 ± 11.4 vs 31.3 ± 12.5 ng/ml, $p<0.001$) per l'effetto inibitorio di T e DHEA sulla sintesi leptinica.
Le PCOS obese insulino-resistenti (IR) presentano livelli di leptina più alti rispetto alle PCOS obese non-IR (23.4 ± 10.6 vs 16.5 ± 6.1 ng/ml, $p<0.001$) per l'elevata iperinsulinemia compensatoria che, opponendosi all'inibizione androgenica, stimola la secrezione di leptina in sinergia con il peso corporeo.
Nelle PCOS normopeso IR i livelli di leptina non differiscono dalle PCOS normopeso non-IR (8.2 ± 3.4 vs 7.8 ± 3.4 ng/ml, NS), perchè la lieve iperinsulinemia è controbilanciata da un aumento più significativo di androgeni. Il Test di Pearson per le correlazioni parziali, corretto per il BMI, mostra come l'aumento della leptina si associa esclusivamente all'aumento dell'LH e al peggioramento dell'IR ($p<0.001$).
In conclusione, i livelli di leptina nella PCOS sono inappropriatamente inferiori rispetto alle donne sane, in base al grado di obesità e di insulinemia. Le leptine dimostrano nella PCOS un comportamento complesso, direttamente correlato con il BMI, ma anche modulato dal bilancio fra iperandrogenismo e differenti gradi di insulino-resistenza.

Fertil Steril 2002; 78(3):479-486

128

PRECIPITAZIONE CON PEG COME TEST DI SCREENING PER MACROPROLATTINEMIA CON IMMULITE 2000.

Falciani C., Bombara M., Palla A.,* Vairo S., Mantovani D., Razzano C., La Gioia A.

U.O. Patologia Clinica, ASL 6 Livorno
*U.O. Analisi Ch.Cliniche e Microbiol., ASL6 Piombino

La Prolattina (PRL) può essere presente nel siero in forme con differente peso molecolare; prevalente è l'ormone nativo monomerico (23 kDa), ma possono essere presenti quantità rilevanti di big-big PRL o macroPRL (150-170 kDa), costituita da complessi tra l'ormone ed IgG, che può essere la forma predominante in un numero significativo di campioni con iperPRL. Risultati analitici elevati di PRL, possono essere quindi non correlati con l'effettiva situazione clinica.
Scopo di questo studio, è valutare l'appropriatezza del metodo di precipitazione con PEG, come test di screening per macroPRL, in campioni iperprolattinemici, utilizzando il sistema analitico, in chemiluminescenza, Immulite 2000 (DPC, Los Angeles, CA, USA), classificato, in un recente studio della United Kingdom National External Quality Assesment Scheme (UKNEQAS), come metodo medio-interferente con la macroPRL presente nel siero.
Sono stati analizzati n. 86 campioni ematici con valore di PRL > 30 ng/mL, utilizzando il sovranatante dopo precipitazione dei campioni con PEG 6000.
La riproducibilità del metodo è stata valutata in cinque campioni, con differenti valori di PRL, dosati in triplo, in cinque giorni successivi; abbiamo misurato un CV% interassay medio di 6.81, un CV% intraassay medio di 2.07 ed un recovery medio di 112%, intendendo per recovery la percentuale di PRL misurata nel sovranatante, dopo trattamento con PEG, rispetto a quello misurato nel campione non trattato.
Come indicato nella letteratuta più recente, abbiamo calcolato il recovery dei nostri campioni e, seguendo due studi presentati recentemente da E. Urgell e collaboratori e da F. Berlitz al 14th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory, abbiamo utilizzato, per valutare i nostri risultati, i seguenti cut-off, validati da dosaggi paralleli con cromatografia in gel-filtrazione:
Recovery > 75%: probabile assenza di macroPRL; recovery < 75% : probabile presenza, in quantità significativa, di macro-PRL; recovery < 50%: probabile prevalenza di macro-PRL. Nel nostro studio abbiamo ottenuto 7 campioni con recovery < 50% e 3 con recovery tra 50 e 75%, per un totale di 11.6% campioni con probabile presenza di macro-PRL.
Dal momento che la cromatografia in gel-filtrazione, considerata il metodo di riferimento per la identificazione della presenza di macroprolattinemia, non può essere introdotta in routine, il nostro laboratorio si propone di indagare i campioni con PRL > 30 ng/mL con il metodo della precipitazione con PEG, ritenuto, in letteratura, metodo sensibile ed altamente riproducibile, e quindi valido test di screening per la macroprolattinemia.

129

SERUM MACROPROLACTIN DETERMINATION: COMPARISON WITH TWO IMMUNOASSAYS.

Grasso L., Manetti L, Centoni R., Mammoli C., Cioffari V., Garzella G., Genovesi M., Lupi I., Pinchera A., Martino E..

Department of Endocrinology and Metabolism, University of Pisa, Pisa, Italy

In addition to biologically active prolactin (PRL) in serum several nonactive fraction of macroprolactin MPRL with different molecular size are present .The major isoform is 25KDa single chain polipeptyde wich comprises up to 80% of total serum PRL. Two other isoforms with high molecular mass (Big –PRL: 45-60 KDa) and (Big-Big PRL: >100 KDa) are present in the serum. This macroprolactin can be detected using common immunoassay resulting in elevated serum PRL concentration. The aim of the present study was to compare the measurement of MPRL using two different chemiluminescent immunoassays in hyperprolactinemic patients.
Sera from 100 patients with elevated serum PRL concentrations were screened for MPRL: serum PRL concentrations were measured using two methods: Abbott Architect 2000 (A) and Beckman Coulter UniCel DxI 800 (B) immunoassays kit and in the supernatant obtained after polyethylene glycol precipitation (PEG). Serum PRL concentration ranged 30.5-136 ng/ml and 4.2-92 ng/ml using A assay before and after PEG precipitation respectively; the same samples ranged 7.7-114 ng/ml with B assay. PRL recovery (R) was obtained as a percent ratio between PRL assessed in the supernatant and in the serum: according to Olukoga and Kane (Clin Endocrinol,1999), a PRL % <40 % is indicative of MacroPRL. Using A assay ,after PEG precipitation , PRL %R <40% in 51% of serum samples: 48% of high serum PRL samples measured by A assay were in the normal range with B assay,while there was a good concordance between B and A assay after PEG precipitation .
A positive correlation was present between B and A assay ($r = 0.7$, $p < 0.0001$), however a better correlation there was between B and A assay after PEG ($r = 0.9$, $p<0.0001$). If we consider only serum samples with macroPRL the correlation between B and A assay was clearly lower ($r = 0.4$, $p<0.05$). In conclusion, the B immunoassay does not recognizes macroPRL in sera of hyperprolactinemic patients. Thus , this method can avoid the PEG precipitation, saving time and money for screening of hyperprolactinemic patients.

130

ASPETTI METABOLICO-IMMUNOLOGICI NELLA CARDIOPATIA DELL'OBESO: POSSIBILE RUOLO DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE.

•Corsi M.M.; Malavazos A.; Morricone L.; Rossi A.; •Passoni D.; *Coman C.; Ambrosi B.

•Istituto di Patologia Generale, U.O. di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Medico Chirurgiche, *Servizio di Ecocardiografia, Istituto Policlinico San Donato, Università degli Studi di Milano.

Il tessuto adiposo svolge un importante ruolo come organo endocrino deputato alla secrezione anche di citochine proinfiammatorie probabilmente implicate nella patogenesi dell'obesità e delle sue complicanze. Nell'obesità sono presenti anomalie cardiache (ipertrofia delle pareti, aumento della massa del ventricolo sinistro (VS) e alterazioni della fase diastolica di riempimento ventricolare) più evidenti in presenza di distribuzione viscerale. Scopo dello studio è stato quello di valutare una possibile correlazione tra alcune citochine proinfiammatorie e le anomalie cardiache dell'obesità. Sono state studiate 20 donne obese (OB), normotese, in età fertile (21-50 anni, BMI 43.9±4.7) e 12 donne (C) come gruppo di controllo (23-49 anni, BMI 22±1.7). L'entità del tessuto adiposo intraddominale (VAT) è stata misurata mediante TAC: 13 pazienti (pz) avevano VAT>130 cm² gruppo A e 7 pz avevano VAT<130 cm² gruppo B. Nel gruppo OB si è evidenziato un aumento di alcune citochine pro-infiammatorie: TNF-α (OB: 12.5±0.9 vs C: 9.1±0.6, pg/ml, $p<0.02$), IL-6 (OB: 14.3±3.8 vs C: 8.8±3, pg/ml, $p<0.04$) e sTNF-R-I (OB: 1384.5±61.4 vs C: 769.5±44, pg/ml, $p<0.03$). Nel gruppo OB si è osservato un aumento di alcuni parametri ecocardiografici: volume del VS, massa del VS indicizzata ($g/m^{2,7}$), spessore della parete posteriore (PP) e del setto, tempo di rilasciamento isovolumetrico e di decelerazione del flusso precoce (TD). In relazione alla quantità di VAT si sono evidenziate alcune differenze: sTNF-R-I (A: 1419±89.5 vs B: 1320±57.9, pg/ml, $p<0.04$), PP (A: 1.1±0.1 vs B: 0.9±0.1, cm, $p<0.03$); TD (A: 217.8±35.9 vs B: 182±29.2, ms, $p<0.03$), PCR (A: 1.3±0.2 vs B: 0.6±0.1, mg/dl, $p<0.05$). Non si sono osservate correlazioni tra i valori di citochine ed i parametri ecocardiografici. Conclusioni: 1) L'aumentata produzione di alcune citochine proinfiammatorie, più spiccata nell'obesità viscerale, si accompagna ad alterazioni ecocardiografiche, inducendo quindi una "low grade inflammatory sindrome" causa di aumentato rischio cardiovascolare. 2) La mancata correlazione fra le alterazioni delle citochine e le alterazioni cardiache deve essere ulteriormente indagata su una più vasta casistica.

131

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' ALLA PROLATTINA SU STRUMENTO LIAISON®.

Amadori P., Marcolla A*., Menapace P*

A.P.S.S. Trento – Servizio ambulatoriale di Endocrinologia
* TSLB Mattevi E. - A.P.S.S. Trento - Ospedale di Cles

Accanto alla prolattina monomerica (PRL) di peso molecolare di 23 kDa, nel siero umano si ha la presenza di due altre forme, "Big PRL, di 50-60 kDa e Big-Big PRL, di 150 kDa o più, chiamata correntemente "macroprolattina" costituita da un immunocoplesso fra PRL e una IgG anti-PRL.
La macroprolattina è riconosciuta in modo variabile dai dosaggi immunometrici e questo conduce a confusione diagnostica nella valutazione degli stati iperprolattinemici. La sua incidenza è riportata fra il 15% e il 26% di tutti i sieri iperprolattinemici. Il metodo più comunemente impiegato per individuare la presenza di macroprolattina è il doppio dosaggio della PRL prima e dopo precipitazione della macroprolattina con PEG, con successiva determinazione della percentuale di recupero.
Scopo del nostro lavoro è stato valutare la sensibilità alla macroprolattina del metodo Sorin LIAISON® confrontandola con Roche Elecsys®.
I sieri di 23 donne seguite per macroprolattinemia e di 14 soggetti sia normo che ipeprolattinemici, senza rilevante presenza di macroprolattina sono stati dosati con i metodi Roche Elecsys® e Sorin LIAISON®. Inoltre un'aliquota di ogni siero è stato trattato con PEG 6000 diluito al 25% e centrifugato per 30' allo scopo di precipitare la macroprolattina, e ritestato su Roche Elecsys®. Recuperi di PRL < 40% del basale sono indicativi di rilevante presenza di macroprolattina.
I valori di PRL ottenuti su Sorin LIAISON® nei sieri senza macroprolattina indicano un'elevatissima correlazione con Roche Elecsys® (r^2=0,999), ma con una costante sottostima rispetto a questo metodo (circa 20% in meno).
I valori di PRL ottenuti su Sorin LIAISON® nei sieri con macroprolattina sono nettamente inferiori rispetto a Roche Elecsys® (<50%), con una buona correlazione fra i due metodi (r^2=0,89).
Il metodo Sorin LIAISON® appare nettamente meno sensibile alla macroprolattina rispetto a Roche Elecsys®. Con questo metodo è probabile che una parte di sieri contenenti macroprolattina diano valori di PRL normali o appena aumentati, evitando quindi una diagnosi errata di iperprolattinemia vera patologica. Tuttavia anche questo metodo non è insensibile alla macroprolattina, la cui presenza va comunque considerata fra le cause possibili di iperprolattinemia
Bibliografia: Smith TP, et. al. - Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2002 **87** 5410-5415.

132

FLUTTUAZIONI ANDROGENICHE IN DONNE SANE FERTILI CON UNA NORMALE FUNZIONE SESSUALE: RISULTATI PRELIMINARI

Pontillo M.; Daverio R.; Salonia A*.; Fabbri F.*; Zanni G.*; Lanzi R.**; Bonini P.A.

Diagnostica e Ricerca San Raffaele
* U.O. e Cattedra di Urologia
** Endocrinologia Università Vita-Salute Istituto Scientifico H. San Raffaele, Milano

Introduzione ed Obiettivi. Lo scopo di questo studio è quello di valutare i valori degli androgeni sierici nel corso del ciclo sessuale, in accordo con le linee guida approvate della Commissione Nazionale per gli Standard Clinici di Laboratorio (NCCLS), in donne normo-cicliche, sane, fertili con una normale funzionalità sessuale.

Materiali e Metodi. Ottantacinque volontarie sane (età media: 33,6 anni; range: 21-49) sono state studiate mediante: anamnesi medica e psicosessuologica semi-strutturata, Female Sexual Function Index (FSFI); Beck inventory for depression (BDI); Female Sexual Distress Scale (FSDS); valutazione metabolica baseline. Stabilita normale ciclità mestruale e funzione sessuale, in ciascuna donna è' stato eseguito un dettagliato profilo ormonale (FSH, LH, E2, progesterone, prolattina, SHBG, testosterone (T) libero e totale, DHEAS, delta4-androstenedione, cortisolo) durante le fasi del ciclo mestruale (fase medio-follicolare, ovulatoria e medio-luteale), in accordo con le linee guida NCCLS.

Risultati. Profilo androgenico durante il ciclo mestruale (media± ES; range): fase follicolare: T-totale (ng/ml): 0.42±0.02 (0,14-1,1); T-libero (pg/ml): 0,96±0,06 (0,14-2,71); SHBG (nmol/L): 77,2±5,5 (13,2-229,0); Free Androgen Index (FAI): 2,88±0,29 (0,94-6,57); delta4-androstenedione (ng/ml): 1,8±0,07 (0,5-3,6); DHEAS (ng/ml): 1900,3±108,3 (468-5800); prolattina (ng/ml) 11,1±0,7 (2,7-42,5) cortisolo (ng/ml): 121,5±5,8 (32,5-207,8); fase ovulatoria: T-totale: 0.50±0.02 (0,17-1,04); T-libero: 1,02±0,06 (0,20-3,01); SHBG: 81,0±7,01 (16,0-257,0); FAI: 3,43±0,36 (1,30-6,91); delta4-androstenedione: 1,9±0,09 (0,30-3,64); DHEAS: 1900,3±108,3 (468-5800); prolattina: 11,1±0,7 (2,7-42,5); cortisolo: 115,2±7,1 (66,1-194,4); fase luteale: T-totale: 0.50±0.01 (0,13-0,94); T-libero: 1,1±0,1 (0,24-3,06); SHBG: 93,1±7,0 (7,2-257,0); FAI: 3,1±0,52 (1,17-8,09); delta4-androstenedione: 2,0±0,1 (0,3-3,9); DHEAS: 2059,5±148,1 (250-6080); prolattina: 12,2,1±0,9 (2,9-60,7); cortisolo: 115,5±9,8 (50-256).
Conclusioni. Questi risultati preliminari rappresentano un dettagliato profilo androgenico durante il ciclo mestruale in donne normo-cicliche, sane, fertili e con normale funzione sessuale. E' necessario un maggior numero di soggetti al fine di normalizzare i valori ormonali degli androgeni in accordo con le linee guida NCCLS.

133

ALLUMINIO IN PAZIENTI IN DIALISI: IMPORTANZA DI UNA CORRETTA PROCEDURA DI PRELIEVO.

Tappi A., Benincaso L., Bottalico S., Ceddia M. Tappi C.

I Laboratorio Analisi Azienda Ospedale-Universita' Foggia

SCOPO L'alluminio appartiene alla categoria degli elementi in tracce. La barriera cutanea e polmonare, un assorbimento intestinale inferiore all'1 % della quota introdotta per via orale e una via di eliminazione essenzialmente urinaria(dal 5 fino al 50 % del filtrato) sono i mezzi fondamentali messi in atto dall'organismo per mantenere in tracce la concentrazione di metallo di cui é ormai ampiamente dimostrata la potenziale tossicità, in condizioni di accumulo, per differenti tipi di cellule, sistemi cellulari e tessuti.
Il procedimento raccomandato per il prelievo consiste nel raccogliere il sangue per caduta, da cateteri già posizionati in vena, in provette di plastica testate per la contaminazione da alluminio, in modo da evitare la contaminazione da aghi o provette in vetro.
Al fine di rendere più semplice questo procedimento si è deciso di testare quindi le provette di vetro in uso in laboratorio e di effettuare i prelievi con vacutainer su pazienti emodializzati che effettuano periodicamente il controllo di questo parametro.
METODI Lo strumento utilizzato è uno spettrofotometro ad assorbimento atomico Varian con fornetto di grafite.Le provette in uso sono in vetro della BD da 10 ml senza additivi e provette in plastica della Kima già testate per la contaminazione da alluminio.
25 pazienti sono stati selezionati casualmente in una popolazione di emodializzati.
RISULTATI Dalle determinazioni effettuate si ottengono valori differenti per i due tipi di provette, ma l'analisi statistica effettuata con il test di Student per dati appaiati (T=1.63 P=0.107) dimostra che la differenza non è statisticamente significativa, mentre la variabilità dei risultati sugli stessi pazienti suggerisce in ogni caso una analisi attenta del procedimento di prelievo al letto del paziente, in maniera da ridurre l'inquinamento da alluminio, dovuto ad una non corretta pratica infermieristica.
BIBLIOGRAFIA
DAL FARRA M. : La correzione del fondo con effetto Zeeman , Laboratorio 200, 1,44 (1987)
SALVIN W : Atomic absorption spectroscopy. Innterscience, New York (1968)
CANAVESE C. : La patologia ossea da alluminio Wichtig Editore, Milano

134

VALORI NORMALI DELLA CDT, CONFRONTO TRA DIVERSI METODI

M. T. Trevisan, M.T.Avogaro, C. Tosetti, G. Bonadonna, F. Bortolotti*, M.Trettene*, G. De Paoli*, F. Tagliaro*

U.O.A di Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche. Azienda ULSS20 Verona.
* Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica Sezione di Medicina legale, Facoltà di Medicina. Università degli Studi Verona

La transferrina desialata (CDT) è utilizzata come marker di abuso alcolico. Nel nostro laboratorio il test è eseguito con un metodo di screening immunometrico (IM), seguito, per valori di CDT elevati (> 2,6% della transferrina totale) da un test di conferma in elettroforesi capillare (CE). Il cut-off utilizzato è desunto dalla letteratura e da nostri precedenti studi preliminari.[1]
Scopo del lavoro è stato verificare quali fossero i livelli di CDT in un campione di popolazione autoctona confrontando entrambe le metodiche in uso.
Materiali e metodi: è stato analizzato un campione di di 100 soggetti sani (M: 51, F: 49; età media 35 aa) sottoposti ad esame obiettivo, sui quali sono stati eseguiti AST, ALT GGT ed emocromo. Il dosaggio della CDT è stato eseguito con IM e con CE[2]. **Analisi statistica:** il campione è stato sottoposto al test di Kolmogorov-Smirnov, al calcolo di media, mediana e percentili; al test T-Student per il confronto tra maschi e femmine; al test di regressione Passing-Pablok per la correlazione tra i due metodi.
Risultati: i test ematochimici erano nella norma. I valori di CDT sono riportati in tabella:

	CDT% IM			CDT% CE		
	Tot.	M	F	Tot.	M	F
N° paz.	100	51	49	100	51	49
Media	1,9	1,8	2,04	1,4	1,49	1,27
Mediana	1,95	1,9	2,0	1,31	1,4	1,13
Dev.st	0,3	0,31	0,33	0,5	0,52	0,50
97,5°perc.	2,6	-	-	2,35	-	-

Dal confronto dei risultati ottenuti con IM, si evidenzia un aumento significativo (p 0,0029) dei valori medi della CDT nelle femmine rispetto ai maschi (F:2,04; M:1,8%). I due metodi non sono correlati, IM presenta valori superiori di CDT rispetto a CE.
Conclusioni: I cut-off utilizzati attualmente e quelli ricavati dall'analisi statistica sono sovrapponibili ai dati in letteratura. Con IM sembra che il gruppo delle femmine presenti valori più alti rispetto a quello dei maschi, ma i dati andrebbero confermati su un campione più ampio. Il fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che IM non è in grado di separare completamente la frazione trisialica dalla disialica della transferrina. La scarsa correlazione tra i due metodi conferma la necessità, per valori superiori al cut-off in IM , del test di conferma in CE.
1-Bortolotti et al. For. Sci. Intern.: 128 (2002) 53-58
2-Tagliaro et al. Electtrophoresis 19 (1998) 3033-39

135

APOPTOSIS DOES NOT CORRELATE WITH SURVIVAL AND RESPONSE TO CHEMO-RADIO THERAPY IN CELL LINES

Arnolfo E., Fruttero A., Lo Nigro C., Lucio F, Russi E.G., Taricco E., Ungari S.

[1] SC Laboratorio Analisi, Settore Biologia Molecolare, [2] SC Radioterapia, [3] SC Anatomia Patologiaca, ASO S. Croce e Carle, Cuneo

It is commonly believed that tumor cells treated with anticancer agents, chemotherapy and/or radiation, die by apoptosis and that tumors that do not undergo apoptosis are resistant to treatment.
We compared the apoptosis induced by chemo and/or radiotherapy with other cellular effects such as cell survival, clonogenic capability, cell cycle perturbation and necrosis. We used two different murine cell lines: the teratocarcinoma F9 cells, which are rapidly proliferating, and the MG1361 mammary adenocarcinoma cells, with a low clonogenic capacity and a longer doubling time.
Cells were treated with the equivalent of clinical doses of cisplatin and/or radiation; each treatment induced different type of damage. Both cisplatin and radiation induced cell death, but the level of induced apoptosis is low and there was no correlation with the results of the clonogenic assays and the cell cycle phase. The cell death and the reduction of clonogenic capability we observed is not dependent by the induction of the apoptotic process.
Our results suggested that cell death induced by radio-chemoterapy does not depend on the induction of apoptotic process and that apoptosis, cell kinetics and clonogenicity suppression are indipent processes and are related to the cell types.
Differential induction of cell damage is related to different signaling pathways and the efficiency of cell cycle controls rather than induction of apoptosis may determine the efficacy of the therapy.

Reference: Sheridan MT, West C. "Ability to undergo apoptosis does not correlate with the intrinsic radiosensitivity (SF2) of human cervix tumor cell lines", Int J Radiation Oncology Biol Phys, 50, 2: 503-509 (2001).

136

STRAGI DEL SABATO SERA: ESPERIENZA DI RIMINI

Filocamo M., Tura M., Arlotti C., Casali D., Peruzzi F. Arcangeli M., Semprini B., Di Pinto A., Di Ninno E.* Di Rita R. * , Apicella G. * , Ceroni V.

U.O. Medicina di Laboratorio Ospedale "Infermi" Rimini
Sezione Polizia Stradale Rimini *

Dato l'elevato numero di giovani deceduti a seguito di incidenti nei fine settimana (fenomeno noto come "stragi del sabato sera"), su specifica richiesta del Ministero dell'Interno, la Prefettura di Rimini ha attivato nella estate del 2003, un programma finalizzato alla sensibilizzazione del problema del consumo di droghe e della sicurezza stradale, chiedendo la fattiva collaborazione della Sezione FarmacoTossicologica della Medicina di Laboratorio.

Il progetto prevedeva la presenza di n° 2 Sanitari esperti che, in orario 01.00 - 07.00 delle giornate di sabato/ domenica, in contemporanea ai controlli effettuati dalla Polizia di Stato, relativamente l'art.186 "Guida in stato di ebbrezza", sottoponessero al controllo per " Guida sotto l'effetto di sostanze Stupefacenti " (art. 187) i fermati.

A tale scopo un camper è stato attrezzato a Laboratorio Mobile e si è standardizzato un protocollo che prevedeva:

1. Informazione su finalità e modalità dell'accertamento
2. Consenso/Rifiuto firmato all'accertamento
3. Raccolta anamnestica
4. Raccolta a vista campione urinario e suddivisione dello stesso in tre aliquote, sigillate e controfirmate, rispettando la procedura di "Catena di Custodia" della nostra Unità Operativa.

Una aliquota veniva utilizzata in loco per il dosaggio di Amfetamine/Metamfetamine, Cocaina, T.H.C., Oppiacei e Benzodiazepine con test rapido (TOX/See Multi-Drug (Screen Panel - Ditta Biorad), la seconda aliquota veniva usata il giorno successivo in Laboratorio per l'analisi di conferma con metodica cromatografica, e la terza congelata, per far fronte alla richiesta di eventuali contestazioni. Sono stati fermati e controllati per abuso alcolico **215** conducenti, **95** dei quali (pari al 44.6%) sono risultati positivi al test dell'etilometro. Degli stessi, **48** sono stati sottoposti anche al test di screening per sostanze d'abuso risultando:

- **20** (pari al 41,6%) positivi al test di screening ed al successivo test di conferma
- **6** positivi allo screening ma non alla conferma
- **4** rifiutavano di sottoporsi al test

La Cannabis (90%) è risultata la sostanza maggiormente assunta, seguita dalla Cocaina (55%) e solamente un 10% è risultato positivo all'Ecstasy.

Cocaina e Cannabis è stato il riscontro più frequente di poliassunzione. Questo protocollo è garante di tutela dei diritti del cittadino, di accuratezza analitica e di Qualità.

Il programma ha sottolineato l'alto numero di coloro che guidano in abuso di sostanze psicoattive. Istituire un servizio permanente attento e continuo potrebbe risultare forte deterrente ed efficace prevenzione.

Bibliografia:

Alcool/Droga/Farmaci e Sicurezza Stradale S.D. Ferrara et al. Annali I.S.S. vol. 36, n° 1, 2000, pp.1 - 86

137

DETERMINAZIONE DELLA TRANSFERRINA DESIALATA IN ELETTROFORESI CAPILLARE: VARIABILITA' ANALITICA

Palla A., Bombara M., Falciani C., La Gioia A.

U.O. Patologia Clinica Azienda USL 6, Livorno (LI)

Introduzione : la Transferrina Desialata, nota come CDT (Carbohydrate Deficient Transferrin), rappresenta un valido marker biochimico di abuso alcolico cronico. Da quanto riportato in letteratura l'assunzione giornaliera costante di 50-80 g di etanolo per almeno una settimana comporta significativi aumenti della concentrazione ematica di CDT, costituita prevalentemente da disialotransferrina. Il test analitico CDT è impiegato per evidenziare l'assunzione pregressa di bevande alcoliche e viene solitamente richiesto da parte delle Commissioni Mediche Locali deputate alla concessione delle patenti guida. Data l' importanza che il dato riveste in ambito medico-legale è essenziale l'impiego di una tecnica analitica adeguata come l'Elettroforesi Capillare che, rispetto ai metodi immunochimici, consente una migliore separazione delle varie isoforme della Transferrina.

Obiettivo : il presente lavoro si propone di valutare la variabilità analitica della determinazione della CDT% mediante Elettroforesi Capillare al fine di una migliore interpretazione diagnostica del dato numerico.

Materiali e Metodi : le determinazioni sono state eseguite su strumentazione P/ACE 5000 System (Beckman Instruments) con software System Gold 8.1, impiegando capillare di silice fusa (57 cm x 20 μm i.d.). Sono stati impiegati reattivi P/ACE CDT% della Ditta Genedia. Il risultato è espresso come rapporto disialotransferrina/tetrasialotransferrina x 100. Per i saggi intraserie sono stati utilizzati campioni di siero di pazienti selezionati in modo da coprire un significativo intervallo di valori, il numero di replicati è 10. Per i saggi interserie sono stati presi 2 sieri di pazienti a diversa % di CDT e sono stati analizzati in 6 sedute consecutive. I dosaggi sono stati eseguiti in singolo.

Risultati : Intraserie Interserie

Media (%)	0,94	1,67	2,68	3,17	4,09	1,03	3,96
DS	0,20	0,24	0,28	0,32	0,66	0,32	0,71
CV%	20,9	14,4	10,5	10,1	16,1	30,0	18,0

Il profilo di imprecisione del test CDT% ha consentito di evidenziare i valori di CV% corrispondenti alle varie concentrazioni, comprese quelle di maggiore interesse in ambito forense.

Conclusioni : il test CDT% in Elettroforesi Capillare con il metodo descritto è caratterizzato da un CV% di circa 12% in corrispondenza del valore soglia impiegato (2,3%). La rilevanza del risultato analitico giustifica l'introduzione nel referto, come dato aggiuntivo, del CV% ottenuto al fine di ottimizzare la valutazione diagnostica del test.

Riferimento bibliografico : Arndt T. Clinical Chemistry 2001; 47: 13-27

138

DETERMINAZIONE HPLC DI LAMOTRIGINA E OXACARBAZEPINA METABOLITA

Panzali A., Bazzurini A., Gervasi M.

3° Laboratorio Analisi, A.O. Spedali Civili di Brescia

Scopo di questo studio è stato quello di validare l'Antiepileptics HPLC Reagent kit, (BIO-RAD, cod. 195-6000) per il TDM di lamotrigina (Lamictal) e oxcarbazepina (Tolep). Entrambe le versioni del kit commercializzate nel periodo agosto 2002 - febbraio 2004, pur essendo state validate dal produttore per la determinazione di lamotrigina (LG), ma non di 10-idrossicarbazepina (M-OXA, metabolita attivo della oxcarbazepina) non permettevano un'ottimale separazione cromatografica di alcuni farmaci occasionalmente o frequentemente cosomministrati (fenobarbitale). **Metodo:** il siero, estratto su colonnine a fase inversa e separato mediante procedura cromatografica HPLC isocratica a fase inversa, è quantificato con rivelatore UV/VIS e impiego di standard interno. **Calibratori:** 10-hydroxycarbazepine GP 47779, ditta Novartis; Serum standard lamotrigina, ditta BIO-RAD, contenuto nel kit. **Controlli:** preparati in laboratorio utilizzando un pool di sieri di pazienti in monoterapia con Lamictal o Tolep in modo da ottenere due livelli di concentrazione (Low: LG 5 e M-OXA 10 mg/L; Medium: LG 10 e M-OXA 20 mg/L). **Modifiche al metodo e tempi di ritenzione** (TR) delle due molecole di interesse e del più frequente possibile interferente:

	kit BIO-RAD	**Modifiche**
Ricostituire St LG con 1mL	H2O	St M-OXA 10 mg/L
Fase mobile	TQ	Diluita 1:1,2
Flusso, mL/min	1,4	1,3
Temperatura, °C	50	40
Durata cromat, min	15,5	21
TR LG, min	4,7	**8,5**
TR fenobarbitale, min	4,9	**9,4**
TR M-OXA, min	4,9	**9,9**

Risultati. L'imprecisione (CV) tra giorni è di 8,7 e 8,9 % rispettivamente per concentrazioni di LG di 5 e 10 mg/L, e di 7 e 9,4 % rispettivamente per concentrazioni di M-OXA di 10,5 e 20,6 mg/L. I limiti di determinazione sono 0,5 (LG) e 1 (M-OXA) mg/L. Nessuno dei tre campioni di LG della VEQ Farmacontrol 2003 era fuori limiti di accettabilità. Non si sono osservate interferenze analizzando il siero di 60 pazienti in terapia con LG o OXA e altri farmaci (amicacina, ceftriaxone, clobazam, dipropilacetato, eparina, estradiolo, fenitoina, fenobarbitale, gabapentin, leviracetam, lorazepam, mianserina, omeprazolo, primidone, topiramato). Abbiamo adottato gli intervalli terapeutici di 10 – 60 umol/L (LG) e di 50 –140 umol/ L (M-OXA) recentemente suggeriti **(1).**

In conclusione, le modifiche apportate permettono di utilizzare l'Antiepileptics HPLC kit (BIO-RAD) per la misura di lamotrigina e 10-idrossicarbazepina (metabolita attivo del farmaco oxacarbazepina) in un'unica seduta analitica.

(1) Ther Drug Monit 2003;25:347-63.

Si è osservata una notevole sovrapposizione delle concentrazioni di LG e M-OXA appartenenti a pazienti con e senza effetti collaterali o a pazienti che rispondono o non rispondono alla terapia.

139

METODO DI DETERMINAZIONE IN HPLC-UV DELL'ACIDO MICOFENOLICO NEL SIERO

Gechtman C.*, Molinaro M.[#], Carazzone C.[#], Genovese S.*, Masarin A.*, Regazzi Bonora M.[#], Zoppi F.*.

* A.O. Ospedale Niguarda Cà Granda – Milano
[#] Dip. di Farmacologia, Policlinico S. Matteo – Pavia

L'Acido Micofenolico (MPA), somministrato come suo profarmaco in forma di estere dell'Alcol Mofetilico (Mofetil Micofenolato, Cellcept® - Roche) viene normalmente misurato nel plasma/siero o con tecniche fisiche (HPLC-UV, HPLC-MS) o con una tecnica EMIT (Dade-Behring). L'anticorpo usato ha reattività crociata per il metabolita M2: i valori ottenuti in EMIT sono mediamente superiori del 20% a quelli HPLC. La determinazione in HPLC risulta necessaria qualora si debba calcolare l'area sotto la curva (AUC) per trarre considerazione di ordine farmacocinetico. La ditta produttrice del Cellcept® aveva preconizzato di non applicare allo MPA il monitoraggio terapeutico (TDM). Poi si osservò che la valutazione dell'AUC porta un beneficio clinico al paziente: 1) le AUC dello MPA sono predittive del rigetto e dell'apparire degli effetti indesiderati; 2) è stato definito l'intervallo di riferimento dell'AUC: fra 30 e 60 μg·h/L. Per intraprendere una serie di tali studi, avendo a disposizione lo standard fornito dalla ditta produttrice del farmaco -ma non lo standard interno (SI) suggerito (RS-60461)- abbiamo utilizzato come SI una sostanza con massimo di assorbimento UV e tempo di ritenzione il più possibile vicini a quelli dello MPA: la Warfarina.

Materiali e Metodi. Calibratore: MPA (Roche) in metanolo, da cui si prepara la curva di calibrazione in plasma (0-40 μg/mL). Standard Interno: Warfarina in soluzione precipitante/estraente (acetonitrile + 1 mL/L di acido fosforico 100 mmol/L), 1μg/mL. Fase mobile: metanolo:acqua 1:1 + 1 mL/L di acido fosforico 85%. Precolonna: Alltima C18, 5μ (7,5×3,2mm, Alltech), Colonna: Viosfer C8, 5μ (150×4,6mm, Violet); Pompa: Constametric 3500 (flusso 1 ml/min), e Spettrofotometro: Spectromonitor 5000 (Thermo Separation Products). 50μL di supernatante del plasma miscelato 1:1 con la soluzione precipitante/estraente sono iniettati nell'HPLC. Tempi di ritenzione: MPA 7-8 min, Warfarina 11-12 min. Lettura UV a 305 nm.

Risultati. Regressione lineare media di tipiche curve di calibrazione nell'intervallo 0-40 μg/mL: Conc.=6,95 (±0,09)×segnale normalizzato + 0,19 (±0,20) μg/mL, r=0,997. Correlazioni: $HPLC_{Milano}$= 0,96 × $HPLC_{Pavia}$ − 0,13 μg/mL, r=0,99, Sy.x=0,40 μg/mL, n=34; $HPLC_{Milano}$=0,90 × EMIT–0,38 μg/mL, r=0,96, Sy.x=0,93 μg/mL, n=78. Imprecisione nella serie (n=20): 0,73±0,05 μg/mL, CV%=7,0; 5,6±0.32 μg/mL, CV%=5,6; 11,62±0,17 μg/mL, CV%=1,5.

Per i ridotti passaggi preparativi e il costo limitato dei reagenti il metodo risulta adeguato al TDM dello MPA.

Bibliografia: Royer B et al. Ann Biol Clin 2003;61:251-8.

140

VALUTAZIONE DEL SISTEMA HITACHI 912 E METODOLOGIA KIMS PER LA DETERMINAZIONE DI OPPIACEI, COCAINA, CANNABINOIDI E AMFETAMINE SU CAMPIONI DI URINA

Ponchia S., Marchioro L., Plebani M.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale di Padova

La ricerca ed il dosaggio delle droghe d'abuso nelle urine è una realtà molto importante nell'ambito della attività di un laboratorio clinico. Il modo più largamente diffuso per la determinazione di sostanze illecite è l'uso di test immunochimici di provata affidabilità. Scopo di questo lavoro è stato la valutazione del metodo KIMS applicato sullo strumento Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Milano, Italia) per la determinazione di Oppiacei, Cocaina, Cannabinoidi (THC) e Amfetamine su campioni di urina. Per ciascuna sostanza d'abuso sono state eseguite le seguenti prove: Imprecisione nella e tra le serie (secondo NCCLS), Riproducibilità Funzionale (o imprecisione a livello di cut-off) e verifica del LOD (Limit of Detection). **Oppiacei**. Imprecisione nella serie: CV livello basso (x_m= 150,9 µg/L) 3,34%; livello alto (x_m= 416,5 µg/L) 1,3%; Imprecisione tra le serie: CV livello basso (x_m= 148,3 µg/L) 9,2%; livello alto (x_m= 407,3 µg/L) 3,9%; Riproducibilità Funzionale (cut-off= 300 µg/L): CV (x_m= 317,4 µg/L) 3,9%; LOD (n= 20): 13,2 µg/L (dichiarato 26 µg/L). **Cocaina**. Imprecisione nella serie: CV livello basso (x_m= 159,2 µg/L) 2,9%; livello alto (x_m= 511,8 µg/L) 0,79%; Imprecisione tra le serie: CV livello basso (x_m= 165,3 µg/L) 6,7%; livello alto (x_m= 523,3 µg/L) 3,2%; Riproducibilità Funzionale (cut-off= 300 µg/L): CV (x_m= 289,2 µg/L) 2,9%; LOD (n= 20): 57,7 µg/L (dichiarato 26 µg/L). **THC**. Imprecisione nella serie: CV livello basso (x_m= 10,4 µg/L) 30,3%; livello alto (x_m= 76,5 µg/L) 5,8%; Imprecisione tra le serie: CV livello basso (x_m= 9,9 µg/L) 61,8%; livello alto (x_m= 65,5 µg/L) 19,1%; Riproducibilità Funzionale (cut-off= 100 µg/L): CV (x_m= 93,8 µg/L) 7,06%; LOD (n= 20): 8,5 µg/L (dichiarato 11 µg/L). **Amfetamine**. Imprecisione nella serie: CV livello basso (x_m= 495,6 µg/L) 3,2%; livello alto 3,4%; Imprecisione tra le serie: CV livello basso (x_m= 492,8 µg/L) 4,0%; livello alto (x_m= 1501,0 µg/L) 4,9%. Riproducibilità Funzionale (cut-off= 1000 µg/L): CV (x_m= 1018,2 µg/L) 2,6%; LOD (n= 20): 33,1 µg/L dichiarato 40 µg/L). Il giudizio risultante dalla valutazione è positivo, con ottime caratteristiche di performance analitiche per tutti i reagenti. I risultati ottenuti per i Cannabinoidi, non in linea con quelli ottenuti con gli altri reagenti, trovano giustificazione dalla tipologia del materiale di controllo (Livello basso) a disposizione per l'espletamento della valutazione. Considerando il cut-off d'uso (100 µg/L) e quello proponibile per il futuro (50 µg/L), assieme alla Riproducibilità funzionale ottenuta, questi pongono lo stesso per un giudizio positivo del reagente. Per quanto riguarda le sensibilità analitiche, le LOD di Oppiacei, THC e Amfetamine si sono dimostrate migliori rispetto a quanto dichiarato. Solo la Cocaina ha dimostrato una LOD ben superiore a quella dichiarata nel foglietto illustrativo, ma comunque di buona garanzia per il dosaggio.

141

OPTIMIZATION OF ASCORBIC AND URIC ACID SEPARATION IN HUMAN PLASMA BY FREE ZONE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Zinellu A.; Sotgia S.; Usai M.F.; Carru C; Deiana L..

Chair of Clinical Biochemistry – University of Sassari

In recent years capillary electrophoresis (CE) has become a useful and powerful separation technique that often exhibits higher resolution and shorter analysis times than HPLC. In addition, the small sample size capability and low reagent consumption recommend the use of capillary zone electrophoresis (CZE) for the analysis of biological fluids in the clinical medical laboratory as an attractive alternative to many current analysis. We propose a new fast free zone capillary electrophoresis method with UV-detection for the simultaneous determination of ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) in human plasma. The effect of analytical parameters such as concentration and pH of borate running buffer, cartridge temperature and sample treatment, on resolution, migration times, corrected peak areas and efficiency was investigated. Good separation was achieved in less than 4 minutes using a 60.2 cm x 75 µm uncoated silica capillary, 100 mmol/L sodium borate buffer pH 8, 25°C at normal polarity, when employing metaphosphoric acid as protein precipitant,. We improved assay specificity and sensitivity by employing a specific wavelength to monitor AA (264nm) and UA (292nm) in relation of their maximum absorbance. These conditions gave a good reproducibility of migration times (CV 0.35 and 0.34%) and peak areas (CV 3.2 and 3.1%) for ascorbate and urate, respectively. The calibration curves Y = 0.00128X + 0.30539 (AA) and Y = 0.00119X + 0.1916 (UA) show a linear response over the range tested with a correlation coefficient R^2 = 0.999 for both analytes. The limit of detection was 0.5 mg/L for both analytes when the detection was performed at 254 nm for AA and at 292nm for UA. We compared the present method, with a validated capillary electrophoresis assay, by measuring plasma urate and ascorbate in 32 normal subjects. Passing and Bablok regression analysis showed a linear relationship between the two assays, indicating that the results obtained by both methods were comparable. The correlation coefficient among the two procedures demonstrated a good agreement (R^2 = 0.97, $p<0.0001$ for both analytes). Due to the speed and the low cost of analysis, our validated method can be a good tool for the assay of ascorbic and uric acid both in research trials and clinical laboratories.

142

I POLIMORFISMI GENICI DEL CYP 450 NEL LA RISPOSTA AI FARMACI

Sacchetti L.^, Toriello M.^, Meccariello P.*, Esposito C.*

Dip. di.Biochimica e Biotecnologie Mediche^, Ceinge Biotecnologie Avanzate (scarl) ^, Dip. Clinico di Medicina Interna, Geriatria, Patologia Cardiovascolare ed Immunitaria e Cardiochirurgia*
Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

La maggior parte dei farmaci sono metabolizzati da enzimi epatici appartenenti alla famiglia del citocromo P450 (CYP 450). Tali enzimi sono presenti in differenti varianti alleliche, associate a diversa attività enzimatica e diverso grado di metabolizzazione dei farmaci. Alcuni studi hanno associato la riduzione del metabolismo di alcuni farmaci, con l'insorgenza di reazioni avverse al trattamento farmacologico. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare in soggetti in terapia con il warfarin, farmaco ad azione anticoagulante metabolizzato dal gene CYP2C9, i polimorfismi del gene, confrontare due metodi per lo studio dei polimorfismi e valutare eventuali associazioni tra polimorfismi e dose del farmaco utile al raggiungimento dell'obiettivo terapeutico, cioè INR tra 2 e 3. La ricerca dei polimorfismi è stata effettuata mediante Real-Time-PCR sia utilizzando lo strumento Light Cycler che l'Abi Prism 7900HT (Taq Man). Sono stati studiati 65 pazienti (31 maschi, 34 femmine, età media di 64 anni) in trattamento con il warfarin per: fibrillazione atriale cronica, sostituzione di valvole cardiache con valvole meccaniche, polivasculopatia severa, cardiomiopatie dilatative e 49 pazienti di controllo. Le frequenze genotipiche ottenute in rapporto all'assunzione di warfarin media settimanale sono le seguenti: (1) CYP2C9*1/*1= 61.4%, 34.21 mg; (2) CYP2C9*1/*2 = 24.6%, 26.01 mg; (3) CYP2C9*1/*3 = 13.2%, 21.07 mg; (4) CYP2C9*2/*2 = 0.8%, 18.75 mg. Esse mostrano differenze statisticamente significative ($p<0.05$) tra i genotipi (1) e (2) e (1) e (3). Tra le due metodologie impiegate la Taq Man sembra possedere una maggiore specificità analitica. (Palkimas M.P. et al.; Journal of.Thrombosis.and Thrombolysis 15 (3), 205-215, 2003

143

CONSIDERAZIONI SUL TASSO PLASMATICO DELLA "LAMOTRIGINA" IN MONO ED IN POLI TERAPIA

Di Nocera P., Belli M., Buongiovanni A., D'Amora M

U.O. di Chimica Tossicologica , A.S.L. Napoli-1

L'obiettivo di questo lavoro è stato di valutare le variazioni del tasso plasmatico del principio attivo "LAMOTRIGINA" somministrato in mono ed in poli terapia (antiepilettica); tanto al fine di contribuire alla prevenzione del rischio da intossicazione farmacologica.
Lo studio è stato effettuato monitorando una popolazione di 986 pazienti ambulatoriali (70% maschi e 30% femmine) di cui 456 assuntori di LAMOTRIGINA, 125 assuntori di LAMOTRIGINA e VALPROATO ,405 assuntori di LAMOTRIGINA ed altri farmaci antiepilettici escluso il VALPROATO.
I dosaggi plasmatici sono stati effettuati con tecnica analitica cromatografica HPLC-UV , utilizzando una retta di calibrazione ottenuta con quattro standard a concentrazione nota e diversa di LAMOTRIGINA contro uno standard interno.
Lo studio ha confermato che :
*Il tasso plasmatico della LAMOTRIGINA, in politerapia con il solo VALPROATO, risulta quasi raddoppiato rispetto a quello riscontrato in pazienti trattati solo con LAMOTRIGINA (a parità di dose e peso).
*Il tasso plasmatico della LAMOTRIGINA in politerapia con altri farmaci (antiepilettici) escluso il VALPROATO, è risultato inferiore a quello riscontrato in pazienti che assumono solo LAMOTRIGINA (a parità di dose e peso).

Bibliografia

1) F. Albani et al. Il monitoraggio terapeutico dei nuovi farmaci antiepilettici : indicazioni cliniche e metodi di analisi
Ligand assay vol. 5 n.ro 1 anno 2000

144

ESAFLUOROISOPROPANOLO URINARIO (HFIP) NELL'ESPOSIZIONE OCCUPAZIONALE AL SEVORANO: VALUTAZIONE MULTICENTRICA

Nonnato A.[1], Bagnati M.[2], Buglione E.[3], Berutti C.[1], Basile M.[2], Cassani C.[2], Porta P.[2], Fortina A.[2], Greghi D.[3], Rossi F[3]., Caropreso A.[1], Bellomo G.[2], Pavan I.[3].

A.S.O. San Giovanni Battista - S.C. Chimica Analitica[1] Torino, A.S.O. "Maggiore della Carità" Lab. R.R.C.C.[2] Novara, Lab. di "Tossicologia ed Epidemiologia Industriale" Osp. C.T.O.[3] Torino

L'ampia diffusione del Sevorano come anestetico generale in chirurgia ha generato la necessità di eseguire controlli ambientali e biologici per valutare l'esposizione professionale al gas anestetico in sala operatoria.
Lo scopo del lavoro è di valutare tre metodi analitici diversi per il dosaggio dell'esafluoroisopropanolo (HFIP) urinario in 26 operatori sanitari esposti al gas anestetico Sevorano. Il 5% del Sevorano respirato viene metabolizzato ad HFIP ed eliminato per via urinaria coniugato con l'acido glucuronico (85%) e in forma libera (15%).
Le urine sono state idrolizzate ed analizzate nei seguenti modi:
a) idrolisi acida, iniezione in spazio di testa nel GC-MS Thermo Electron a trappola ionica, modalità Selected Ion Storage.
b) Idrolisi enzimatica con beta-Glucuronidasi-arilsolfatasi, iniezione in spazio di testa nel GC-MS Perkin Elmer quadrupolare, modalità Selected Ion Monitoring.
c) Idrolisi acida, iniezione in spazio di testa nel GC-ECD Carlo Erba.
I risultati medi e l'intervallo di misura sono:
a) 108 mcg/L (20-1162 mcg/L)
b) 143 mcg/L (10-1390 mcg/L)
c) 97 mcg/L (10-881 mvg/L)
Le correlazioni secondo Passing e Bablok sono:
$a = 0.64\ b + 8.4$ bias 36.3 $p > 0.05$
$a = 1.17\ c + 8.3$ bias –11.3 $p < 0.01$
$b = 1.85\ c + 5.0$ bias –47.6 $p > 0.1$
Nell'ambito delle concentrazioni riscontrate (10-1390 mcg/L) i risultati ottenuti evidenziano una non significativa correlazione tra i metodi, ad eccezione dei due che impiegano l'idrolisi acida.
Risulta di fondamentale importanza per la Medicina Occupazionale definire univocamente la correlazione tra il TLV-TWA di 2 ppm fissato dalla NIOSH per il Sevorano ambientale con il corrispettivo valore biologico dell'HFIP urinario. Attualmente la letteratura riporta dati discordanti che vanno da 488 a 2700 mcg/L.
Riferimenti Bibliografici.
Imbriani M, Zadra P, Negri S, et al. Biological monitoring of occupational exposure to Sevoflurane. Med Lav. 2001 May-Jun;92(3):173-180.

145

SURFACE ACTIVATED CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY IN THE ANALYSIS OF AMPHETAMINES IN DILUTE URINE SAMPLES

Cristoni S.[1], Gerthoux P:M:[2], Gonella E.[2], Brambilla M.[2], Santambrogio M.[2], Mocarelli P.[2]

[1] University of Milan, Centre for bio-molecular Interdisciplinary Studies and Industrial applications CISI, Segrate Milano, Italy
[2] University Department of Laboratory Medicine, University of Milano-Bicocca, Hospital of Desio, Desio, Milan, Italy;

The new ionization method named Surface Activated Chemical Ionization (SACI)[1,2] was compared with Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) and Electrospray (ESI) for the analysis of some amphetamine compounds by Ion Trap mass spectrometry. The performance of SACI in term of limit of detection (LOD) and linearity range was compared with those obtained using APCI and ESI showing that the SACI approach gives rise to the best results. Thus, SACI was used in order to analyze MDA, MDMA, MDE, amphetamine and methamphetamine in urine samples. The urine samples were strongly diluted (1:100) so to prevent both the matrix-sample interaction effect that affects the liquid phase ionisation sources and the column damage due to the matrix composition. The new Saci ionisation source gives rise to high performancerespect to the usuallyemployed APCI and ESI ionisation sources and the results obtained show that SACI source is the most sensible one.
References
1) Cristoni, S.; Bernardi, L. R.; Biunno, I.; Tubaro, M.; Guidagli, F. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003, 17, 1973-1981.
2) Cristoni, S.; Rossi Bernardi, L.; Gerthoux, P.; Gonella, E.; Mocarelli, P. Rapid Commun. Mass . Submitted.

146

VALUTAZIONE DI INDICI DI STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI CON ABUSO ALCOLICO RICOVERATI IN AMBIENTE CLINICO INTERNISTICO PER DISINTOSSICAZIONE.

Giovannini F*; Cioni G**; Floridia A.**; Masini A*; Trenti T***

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, **Unità Operativa di Medicina, ***Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale di Pavullo nel Frignano, Modena

I meccanismi di danno cellulare dovuti ad abuso di etanolo sono ancora da definirsi in particolare nell'uomo. Una delle ipotesi correnti individua nello stress ossidativo una causa importante nella patogenesi del danno organico. Lo scopo della ricerca è stato di valutare l'entità dello stress ossidativo, se presente, in pazienti con abuso alcolico. A questo scopo sono state misurate due molecole chiave di particolare importanza nell'evidenziare la perossidazione lipidica quale evento primario dello stress ossidativo indotto dall'etanolo: la malondialdeide (MDA), come indicatore finale di avvenuta lipoperossidazione delle membrane, ed i lipidi idroperossidi quali prodotti intermedi di questo processo. Questi parametri sono stati valutati al momento del ricovero del paziente e dopo dieci giorni di ricovero e verosimile sospensione del tossico. L'MDA totale plasmatica è stata misurata dopo idrolisi alcalina per rilasciare l'MDA legata alle proteine e quindi determinare l'MDA totale in HPLC con la metodica di Hong Y. Et al (1). Il livello plasmatico degli idroperossidi è stato misurato dopo estrazione lipidica in HPLC secondo Tokumaru A et al. (2). I dati ottenuti su 11 pazienti dimostrano un significativo aumento dell'MDA e degli idroperossidi plasmatici nei pazienti alcolisti al momento del ricovero rispetto a controlli sani. Gli idroperossidi appaiono aumentare in modo particolarmente elevato rispetto all'MDA, indicando come l'evento intermedio di lipoperossidazione sia fortemente indotto in questa condizione. La sospensione dell'uso di etanolo tende a rinormalizzare il quadro, confermando come l'evento lipoperossidativo e lo stress ossidativo sono correlabili al momento di abuso di etanolo, configurando un quadro toxidromico di tossicità acuta. Infatti, in questa condizione la produzione di radicali liberi dovuti all'etanolo è tale da non essere compensata dalle difese antiossidanti cellulari.

(1) Hong Y. Et al. Clin Biochem 2000; 8: 619-625
(2) Tokumaru A et al. Anal Chim Acta 1995; 307: 97-102

147

VALUTAZIONI SULLA RICERCA DEL PROTOSSIDO DI AZOTO (N2O) NELLE URINE DI OPERATORI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI.

Di Nocera P. , Belli M. , Buongiovanni A.

U.O. Chimica Tossicologica A.S.L. Napoli-1

Il presente studio ha avuto, quale obiettivo,l'individuazione di evetuali correlazioni fra il tasso urinario di protossido di azoto e infezioni urinarie già in atto; sperimentalmente, infatti , è stato dimostrato che nelle colture di batteri il processo metabolico di denitrificazione si arresta ad NH3 e N2O. Di questo,quale possibile fattore fuorviante, è opportuno tener conto nel corso di monitoraggio biologico degli esposti professionalmente al gas anestetico N2O.
Lo studio è stato effettuato monitorando sia 160 campioni di urine di pazienti ricoverati presso le diverse UU.OO. di degenza sia 110 campioni di urine di operatori sanitari (chirurghi, anestesisti , infermieri), raccolti ,per ciascuno, prima dell'inizio dell'attività lavorativa e dopo sei ore di esposizione. Su tutti i campioni sono state effettuate le ricerche microbiologiche nonché il dosaggio del protossido di azoto. Il dosaggio del protossido di azoto sui 270 campioni di urine,conservati a 4°C fino al momento di essere analizzati , è stato effettuato con tecnica cromatografica GC-μECD-HS e standard a titolo noto di N2O. I risultati delle indagini microbiologiche sulle urine sono stati i seguenti : su 160 campioni appartenenti a pazienti ricoverati 38 hanno mostrato una significativa infezione batterica e solo quelli con infezioni da E. Coli hanno mostrato una elevata concentrazione di N2O ; cosi pure dei 112 campioni di urine appartenenti agli operatori sanitari delle diverse Sale Operatorie solo 6 hanno mostrato un elevato tasso di protossido di azoto ed una corrispondente elevata carica batterica di E.Coli.
Si conclude che per ogni campione di urina, appartenente ad operatori esposti , che presenti una elevata concentrazione di protossido di azoto , è opportuno procedere anche ad accurate indagini microbiologiche al fine di accertare definitivamente la causa .

Bibliografia
1) Biomonitoring of exposure to nitrous oxide , sevoflurane,isoflurane and halothane by automated GC\ HS urinalysis

148

VALUTAZIONE DEI SISTEMI DI DOSAGGIO DEI METABOLITI DELLA BUPRENORFINA

Filocamo M., Castellana N.* Tura M., Arlotti C., Casali D., Peruzzi F. Arcangeli M., Semprini B., Di Pinto A., Ceroni V.

Servizio di Medicina di Laboratorio Ospedale Infermi Rimini *Laboratorio di Tossicologia e Farmacologia Clinica -Policlinico di Modena

La Buprenorfina è un derivato semisintetico della Tebaina, che esplica un' azione agonista - antagonista sul recettore degli oppiacei. Viene impiegata nel trattamento di disassuefazione dei tossicodipendenti sia da eroina che da cocaina, in quanto è in grado di ridurre gli effetti delle crisi di astinenza del soggetto in terapia. La Buprenorfina viene metabolizzata a livello epatico mediante due processi principali: la coniugazione con acido glucuronico e la N-dealchilazione a Nor-Buprenorfina. Il dosaggio della Nor-Buprenorfina nelle urine è utilizzato per controllare la compliance del soggetto in trattamento sostitutivo. Scopo di questo lavoro è quello di valutare i risultati ottenuti con due diverse metodiche: una immunoenzimatica e una cromatografica, tenendo presente che la prima dosa la sostanza e la seconda il suo metabolita urinario (Nor-Buprenorfina). Sono stati analizzati 64 campioni urinari appartenenti a pazienti in terapia con Buprenorfina da 2 a 20 mg/die con una metodica immunoenzimatica su micropiastra (Cozart Buprenorphine microplate EIA), considerando positivi i campioni superiori a 1 ng/ml. Dei 64 campioni analizzati 2 erano negativi, 4 avevano valori vicino al cut off e 58 erano superiori a 5 ng/ml (ultimo punto della curva di calibrazione). Gli stessi campioni sono stati processati con una tecnica cromatografica (Remedi HS) che può evidenziare la Nor-Buprenorfina mediante analisi diretta o dopo idrolisi enzimatica del campione usando la betaglucuronidasi arilsolfatasi. Il picco cromatografico della Nor-Buprenorfina si evidenzia a circa 5.3 - 5.7 minuti. Nei 2 campioni negativi non è stata evidenziata la presenza del metabolita urinario; dei 62 campioni positivi al test immunoenzimatico 50 sono risultati positivi anche all'analisi cromatografica, mentre i restanti 12 campioni non hanno evidenziato la presenza di nor-buprenorfina . Si può ipotizzare che, in alcuni campioni non è stato possibile rilevare il metabolita a causa della presenza di grosse quantità di sostanze coeluenti quali morfina-n-desmethyl, thioridazina met.2, ecc., in altri campioni non è stato evidenziato il metabolita in quanto inferiore al limite di rilevazione strumentale che è di 80 ng/ml, e in ultima analisi si può supporre che in alcuni campioni la sostanza era presente in quanto aggiunta nelle urine (adulterazione del campione). Possiamo concludere che, con tutti i limiti evidenziati, il sistema Remedi può dare un contributo nella ricerca dei metaboliti urinari della Buprenorfina al fine di valutare l'avvenuta assunzione del farmaco.

Bibliografia

Monitoraggio farmacologico della Buprenorfina a scopo terapeutico
Cangiano G. Manera B. et altri Biochimica Clinica ,2002,vol.26,n.5-6

149

DOSAGGIO DEL METADONE SU CAMPIONI DI URINA: VALUTAZIONE DEL METODO KIMS CON REAGENTI DI 2a GENERAZIONE

Marchioro L., Ponchia S., Plebani M.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale di Padova

Dall'epoca degli esperimenti di Dole[1] (anni 70) e Nyswander migliaia sono state le pubblicazioni riguardo i programmi terapeutici metadonici, con esaltazione sia degli aspetti negativi che positivi di questo tipo di trattamento farmacologico. Sicuramente in questo contesto molto importante è stato il contributo offerto dal laboratorio, al quale sempre più viene chiesto un impegno maggiore che va al di là del semplice riscontro positivo nei confronti di urine della somministrazione metadonica effettuata. Di fronte alle molteplici richieste provenienti dai centri di trattamento e cura della popolazione tossicodipendente (Ser.T. o Servizi per le Tossicodipendenze), le aziende farmaceutiche hanno messo a disposizione numerose metodiche di screening per le sostanze d'abuso. Scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire l'efficacia diagnostica del metodo KIMS (Kinetic Interaction of Microparticles in a Solution) applicato sullo strumento Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Milano, Italia) di nostra dotazione, per il dosaggio del Metadone. La tecnologia Kims sfrutta il legame Antigene/Anticorpo come causa della conseguente interazione cinetica di microparticelle in soluzione, misurata poi come variazione della torbidità della soluzione in esame, rilevabile con misura spettrofotometrica della variazione di assorbanza a 505 nm. In particolare la valutazione ha riguardato il confronto del reagente Metadone II di recente introduzione con quello attualmente in uso. Sono state effettuate le seguenti prove: Imprecisione nella e tra le serie (secondo NCCLS), Riproducibilità Funzionale (o imprecisione a livello di cut-off), verifica del LOD (Limit of Detection) rispetto a quanto dichiarato nelle note illustrative del test e Accuratezza rispetto al reagente di 1° generazione. Tutti i campioni (50 positivi e 50 negativi) testati con questo nuovo reagente hanno fornito risultati dal significato clinico perfettamente coerente con quello ottenuto con il metodo in uso. Il giudizio risultante dalla valutazione è stato positivo, con ottime caratteristiche di performance analitiche, qui di seguito riassunte. Imprecisione nella serie: CV livello basso (x_m= 173,4 µg/L) 2,7%; livello alto (x_m= 513,8 µg/L) 2,3%; Imprecisione tra le serie: CV livello basso (x_m= 167,5 µg/L) 5,2%; livello alto (x_m= 510,7 µg/L) 5,5%; Riproducibilità Funzionale (cut-off= 300 µg/L): CV (x_m= 305,7) 2,7%; LOD (n= 20): 14,3 µg/L (dichiarato 7,0 µg/L). L'unico rilievo da fare riguarda la sensibilità analitica che, rispetto a quanto dichiarato, si è dimostrata superiore (doppia) ma comunque di ottima utilità.

1: Dole V P, Joseph H. Long term outcome of patients treated with methadone maintenance. Ann NY Acad Sci 311:181-189, 1078.

150

ANALISI QUANTITATIVA DEL SIROLIMUS IN SANGUE INTERO MEDIANTE HPLC-MS/MS

Gechtman C.[a], Duca L.[b], Fumagalli C.[a], Masarin A.[a], Zoppi F.[a].

[a]A.O. Osp. Niguarda Cà Granda; [b]Dip. Med. Interna, Policlinico, Milano.

Il sirolimus (rapamicina) è un lattone macrolide prodotto dalla fermentazione dello Streptomyces hygroscopicus. Il suo meccanismo d'azione, come immunosoppressore, è quello di inibire la trasduzione dei segnali delle citochine necessarie per la proliferazione e maturazione dei linfociti T, agendo in uno stadio più tardivo rispetto a quello del tacrolimus o della ciclosporina. Il monitoraggio terapeutico (TDM) del sirolimus nel sangue è importante per definire il regime di dosaggio, la farmacocinetica e l'intervallo terapeutico, e per valutare potenziali interazioni con altre molecole. Il TDM viene richiesto anche per altri immunosoppressori a causa del rischio di rigetto a basse concentrazioni e di tossicità ad elevate concentrazioni. Inoltre la farmacocinetica del sirolimus in pazienti dopo trapianto solido presenta una elevata variabilità interindividuale. Per questo, una misurazione accurata e precisa è vitale per l'uso ottimale del sirolimus.
Attualmente non esistono più saggi immunochimici commerciali, perciò è necessario sviluppare tecniche analitiche accurate e sensibili per la quantificazione del sirolimus in pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido. Nel presente lavoro è stato utilizzato un sistema HPLC-MS/MS. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando l'HPLC-UV.
Materiali e metodi: i campioni di sangue intero vengono estratti in fase liquida secondo il protocollo disposto dalla Wyeth (Studio Gorgone n. AN005). Per la quantificazione si usa come calibratore la rapamicina (AY 22989-54) e come standard interno (SI) la 32-demetossirapamicina (AY 24668-1), entrambi forniti da Wyeth-Ayerst. Viene usato lo strumento LCQ della Finnigan MAT (sistema ottico a doppio octapolo e trappola ionica), interfaccia ESI in ionizzazione positiva, combinato con autocampionatore AS300 e pompa per HPLC P4000 (Spectra System). La colonna, C18 5µ (Antiepileptics II, 150×4,2mm, Bio-Rad), è termostatata a 45ºC. La fase mobile è metanolo:acqua 90:10 con flusso di 0,80 mL/min. Si analizzano gli addotti col sodio del sirolimus e dello SI, usando il modo MS/MS full scan. **Risultati**: La calibrazione è lineare tra 4-60ng/mL con r^2=0,9944. **Correlazione** con l'HPLC-UV: LCQ= 0,88×HPLC + 0,86 ng/mL, r=0,91, $S_{y.x}$=1,92 ng/mL, n=34. **Recupero**: 37,1 ± 11,3%.

Imprecisione	Basso		Medio		Alto	
n=10	**NS***	**FS^**	**NS***	**FS^**	**NS***	**FS^**
Media	3,7	7,2	12,0	11,3	32,8	24,1
DS (ng/mL)	0,4	0,8	0,9	1,0	3,2	2,5
CV%	11,3	11,7	7,5	8,7	9,9	10,5

(*NS: Nella Serie, ^FS: Fra Serie).
Bibliografia: Taylor PJ, Johnson AG. J Chrom B. 1998; 718: 251-7.

151

ANALYSIS OF PHYTOSTEROLS, AND CHOLESTEROL PRECURSORS IN HUMAN SERUM BY GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY (GC/MS)

Ahmida M.H.S., Bertucci P.*, Franzò L.*, Massoud R., Marini I., Cortese C., Lala A., Federici G.

Department of Internal Medicine, University of Rome II, "Tor Vergata", Rome, Italy.
* Department of Clinical Biochemistry, Tor Vergata Hospital, Rome, Italy.

A simple, sensitive and reproducible gas chromatography – mass spectrometry (GC/MS) method has been developed for the determination of phytosterols (sitosterol, and campesterol), and cholesterol precursors (desmosterol, and lathosterol) in human serum. The method involves saponification of the serum sterol esters with ethanolic sodium hydroxide followed by extraction with hexane and ethanol (20:1 V/V); after evaporation under nitrogen stream free sterols are derivatized to trimethylsilyl ethers using N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS). Chromatographic separation of the derivatives was performed using an Rtx®-1701 (14% cyanopropylphenyl – 86% dimethylpolysiloxane) column. Quantitative analysis was conducted using a quadrupole mass spectrometer as detector, operating in the electron impact mode; selected ion monitoring (SIM) was carried out to obtain a higher sensibility, at concentrations as low as 0.5 µM. This method allows quantitative determination of cholest-7-en-3β-ol (lathosterol), 5α-cholest-5,24-dien-3β-ol (desmosterol), which are markers of cholesterol synthesis; 24α-methylcholest-5-en-3β-ol (campesterol) and 24α-ethylcholest-5-en-3β-ol (sitosterol), which are indexes of cholesterol absorption. Using this method, the levels of phytosterols, and cholesterol precursors in serum from healthy subjects and patients with different disorders of lipid metabolism were determined.

152

SEMPLICE METODO PER LA SEPARAZIONE UV HPLC DELLO IOHEXOLO PER LA MISURA DEL FILTRATO GLOMERULARE

Manunta A., Mura GL, Ganadu M.

ASL1 Sassari , PO Ozieri Servizio Nefrologia e Dialisi

La clearance dell'Inulina è considerata lo standard per la misurazione del GFR poiché tale polimero del fruttosio è la sostanza ideale, viene liberamente filtrata dal glomerulo renale, non interfererisce con l'attività dei tubuli renali, non è sintetizzata o degradata dall'organismo ed è inerte fisiologicamente.Nella pratica clinica purtroppo il suo uso non è agevole per la necessità di infusioni endovenose continue e di un campionamento molto accurato delle urine, spesso con cateterismo vescicale. Negli ultimi anni, si sono tentati sistemi alternativi utilizzando varie sostanze talvolta radioattive.Già da qualche tempo è possibile usare per la misurazione del GFR lo Iohexolo, mezzo di contrasto per raggi X non iodato ed a basso peso molecolare di uso routinario in radiologia e considerato essenzialmente esente da effetti collaterali indesiderati.* Inoltre è utilizzabile nei bambini ed in gravidanza, viene filtrato dal glomerulo e si ritrova intatto nelle urine senza segni di secrezione o riassorbimento tubulare. Nella pratica clinica il metodo ha il vantaggio di una unica infusione in bolo endovenoso seguita da alcuni prelievi ematici in tempi determinati e la successiva analisi mediante AUC (calcolo dell'area sotto la curva concentrazione-tempo) da cui si ricava il GFR
Materiali e metodi:
Dopo centrifugazione a t amb. (2500g x 15') il campione puo essere dosato o conservato a –20°C .
Preparazione del campione: 200ul di siero + 500ul di TCA, vortex 30'', centrifugare a 9000 rpm x 2 min. Diluire 1:10 ed inectare 20ul nel sistema cromatografico :
HPLC HP1090 , detector DAD set a 254nm , colonna analitica Waters Nova-Pak C18 3,9x150mm autosampler Varian 9300,;fase mobile: sodio fosfato 10mM a ph 2.5 con ac.fosforico+ 5% acetonitrile. Flusso 1 ml /min , stop time 7 min, clean colonna 2min a 50%acetonitrile Software Baseline
Curva di calibrazione standard su matrice siero , + ist (iopamide) . Lo standard interno non è indispensabile visto il recupero del 100% su precipitazione con TCA. Eseguire la curva ad ogni serie analitica.
Accuratezza del metodo minore di 4%, la precisione analitica presenta un coeficente di variazione di 2,8%
I dati ricavati sono inseriti su foglio elettronico per il calcolo del GFR mediante algoritmo che considera inoltre peso, altezza, etc.
Conclusioni:
Il metodo utilizzato risulta essere semplice , versatile ed economico, e consente la valutazione del GFR con strumentazione HPLC standard di larga diffusione nei laboratori di patologia clinica.

Bibliografia:
Precision of plasma clearance of Iohexol for estimation of GFR in pazient with renal disease
Gaspari F., Remuzzi G. et all - Ist Mario Negri –Nefr dialisi –Bergamo

153

A SIMPLE ASSAY TO DETERMINE TOTAL HOMOCYSTEINE AND OTHER THIOLS BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Gueli M.C.1, Pagano G.2, Gugliotta M.R.

1Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sezione di Biochimica, Policlinico, Università di Palermo, Italy

2Azienda Ospedaliera Universitaria "Paolo Giaccone", Divisione di Ostetrica e Ginecologia, Policlinico, Università di Palermo, Italy

INTRODUCTION: Homocysteine (Hcy), a thiol-containing amino acid, is intimately related to methionine and cysteine metabolism. An elevated concentration of fasting plasma total homocysteine (tHcy) is a risk factor for many diseases ranging from cardiovascular diseases to pregnancy-related diseases. Pregnancy-associated hyperhomocysteinemia is associated with adverse effects of pregnancy such as neural tube defects, abruptio placentae, and preeclampsia. Hyperhomocysteinemia results from enzyme and/or vitamin deficiency. The determination of tHcy levels may provide information for a possible aetiological connection between two apparently unrelated diseases of infancy and adult life: neural tube defects (NTD) and coronary heart disease (CHD).
OBJECTIVE: This abstract describes a modified, rapid, user-friendly, HPLC-FD method for the determination of tHcy and other thiols of interest from only 100(L of plasma.
MATERIAL AND METHODS: SBDF, D,L-homocysteine, L-cysteine, cysteinyl-glycine, GSH, TNBP were purchased from Sigma-Aldrich. We studied tHcy plasma concentrations in 31 healthy subjects (15 men and 16 women; mean age, 43.8 (10.6 and 40.7 (9.0 years, respectively). Briefly: 100(L of plasma and 10(L of the TNBP reagent was incubated for 30 min at 4°C after which 100(L of TCA was added. The clear supernatant was added to an eppendorf containing 10(L of 1.55mol/L NaOH; 100(L of 0.125mol/L borate buffer, pH 9.5 and 10 (L of SBDF solution. The sample was then incubated for 20 min at 60°C. The HPLC system consisted of a 600E Waters pump, Waters 474 fluorescence detector (390 nm ex, 515 nm em) and Waters 746 Data Module. Separation of the SBDF derivatized plasma thiols was performed on a Spherisorb ODS2 (45°C), 0.1mol/L acetic acid-acetate buffer, pH 4.0 as mobile phase.
RESULTS: Using the above-described optimized chromatographic conditions, the elution times for these amino acids are: Cys = 9.19 (0.16, Cys-gly = 13.84 (0.5, Hcy = 15.28 (0.23, GSH = 21.8 (0.47 minutes (means (SD). Calibration curves for homocysteine were linear up to 200?mol/L for sample prepared in Milli-QH20 (r2 = 0.997). The normal reference ranges for tHyc was 3.1-12.9 ?mol/L, for men, and 2.0-8.6 ?mol/L, for women. The sensitivity associated to the semplicity and the lower cost of the HPLC method developed in our laboratory render it useful for future research. This work was supported by grants from the Provincia Regionale di Palermo
REFERENCE
Refsum H. et al (1998) Annu.Rev.Medicine 49, 31-62

154

HPLC ANALYSIS OF SOME SULPHUR COMPOUNDS IN SALIVA: COMPARISON BETWEEN HEALTHY SUBJECTS AND PERIODONTITIS PATIENTS

Zappacosta B.*, Manni A.[@], Persichilli S.[§], Scribano D.[§], Minucci A[§] Giardina B. [§],

§ Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica e [@] Istituto di Clinica Odontoiatrica, Università Cattolica del Sacro Cuore Roma
*Centro di Ricerche ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Saliva is an easily available biological material that is not commonly analysed in clinical chemistry, while it could give useful information especially in several oral diseases. According to different authors, the diagnosis of several diseases affecting the oral cavity could benefit from the analysis of saliva. Furthermore, the easy and practical way of salivary collection largely makes it useful for diagnostic purposes and its use as a diagnostic tool is increasing .
In this work, the sulphur containing compounds cysteine, cysteinylglycine and glutathione were analysed in saliva of control subjects and periodontitis subjects by a HPLC method.
Methods: The detection limit of the method is 0.5, 0.1 and 0.1 μmol/l for cysteine, cysteinylglycine and glutathione respectively and it is linear up to 10 mM.
Results: the median values for the control group are 1.2 μmol/l for cysteine and glutathione and 0.4 μmol/l for cysteinylglycine while those of periodontopathic patients are significantly increased (4.4, 2.1, 11.0 μmol/l for cysteine, cysteinylglycine and glutathione respectively).
The results shown indicate that glutathione and its precursors (cysteine and cysteinylglycine) are significantly present at micromolar range in the saliva of a control healthy population. Interestingly, glutathione concentration in saliva is almost equal to that of plasma while those of cysteine and cysteinylglycine are significantly lower. The HPLC method we used easily measures all these compounds with a low imprecision (CV < 5%) at 1.0 μmol/l concentration. The analysis of these sulphur containing compounds in saliva can potentially give useful clinical information on the pathophysiological condition of oral cavity as shown by the increase of their concentration in periodontopathic patients.

Zappacosta et al. Cinica Chimica Acta 2003; 338: 57-60

155

DOSAGGIO ADMA IN HPLC, SU PLASMA DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO DIALITICO E TRAPIANTO RENALE

Manunta A., Cherchi GL, Campus AM, Canu G. Calvisi L,Ganadu M.

ASL1 Sassari , PO Ozieri Servizio Nefrologia e Dialisi

La dimetil-L-arginina asimmetrica (ADMA) inibisce la formazione di ossido nitrico , un gas che impedisce la coagulazione del sangue , ha effetto vasodilatatore e attenua lo sviluppo dell'arteriosclerosi. Valori elevati di ADMA sono stati riscontrati nell'insufficienza renale cronica per cui la determinazione plasmatica assume un importante procedura diagnostica che richiede metodi precisi accurati e veloci.Nella nostra esperienza di laboratorio specialistico nefrologico abbiamo valutato la possibilità di dosare tale analita senza fare uso di procedure particolari di pulizia del campione con resine a scambio cationico, valutando nel contesto le possibili interferenze dovute alla sola precipitazione proteica con TCA e derivatizzazione OPA.
Materiali e metodi:
I campioni utilizzati allo scopo sono divisi essenzialmente in pazienti in IRC (in trattamento dialitico), pazienti dopo trapianto renale e gruppo di controllo normale provenienti dal n/s servizio di nefrologia e dialisi.
Stumenti analitici:
HPLC HP1090 con autocampionatore ,gradiente binario, detector fluorimetrico DIONEX RF.2000.
Colonna 150x4,6mm Waters Novapac C18, flusso 1.0ml/min temp 35°C .Fase mobile A=82%Na-acetato 50mM+17%metanolo+1%THF,B=22%Na_acetato50mM+77% metanolo +1%THF. La separazione di ADMA , IST(H-arginina) avviene a 18-22 min mentre la completa eluizione di tutti gli aa e quindi la procedura di pulizia e condizionamento della colonna richiede complessivamente 35 min . Il campione di plasma centrifugato e conservato a –20°C è precipitato con TCA granulare , vortex e centrifugato (9000 rpm x 2'). 50ul +10ul IST +100ul OPA (10mg OPA +0,5ml metanolo+ 2ml borato 0.6M+30ulb-mercatoeptanolo). Aspettare 1min e iniectare in loop 20ul .
Linearità 0,2-10. Imprecisione 5% intr-serie, day-to-day 8%
Conclusioni:
Il metodo separa tutti gli aa generando un cromatogramma alquanto ricco di picchi analitici pertanto è richiesta una ottima messa a punto dello strumento analitico (gradiente) nonche la verifica manuale dei cromatogrammi; rispetto al classico sistema con colonne monouso a scambio cationico, inoltre è essenziale uno spettrofluorimetro di ultima generazione , sensibile e con cella a flusso ridotta per poter discriminare l'adma e in ultimo indispensabile una precolonna a cartuccia sostituibile agevolmente (waters Guard-Pak precolumn).
I dati ottenuti con questa metodica confermano l'utilità clinica del dosaggio dell'ADMA nei pazienti con IRC, nei quali gli elevati valori di questo aa, rappresentano un rilevante fattore indipendente di rischio cardiovascolare.
Bibliografia
Determination of ADMA in human plasma by HPLC.
Ben-Mei Chen, Ling-Wei Xia et al–Journal of chromatography 692(1997)

Adma plasma concentration differ in pazient with end-stage renal disease
Bode-Boger et al kidney inter vol 63, sup 84 (2003)

156

TOTAL LYMPHOCYTES COUNT PREDICTS PANCREATIC CANCER SURVIVAL

Gallo N., Fogar P.*, Falda A., Navaglia F., Zambon C.-F.*, Greco E, Sanzari M.C., Basso D., Pedrazzoli S.*, Plebani M.

Department of Laboratory Medicine, *Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

Background: An impaired host immuninity might concur in determining the tremendous prognosis of pancreatic cancer (PC). Our aim was to ascertain whether the pattern of blood lymphocytes immunophenotype in PC correlates with: 1. tumor stage, 2. tumor grade, 3. the development of metastases after surgery, 4. survival. Patients and Methods: We studied 46 PC patients. Staging was: stage I=2.2%, stage II=8.9%, stage III=48.9%, stage IV=40.0%. Grading was: G1=19.4%, G2=47.2%, G3=33.3%. Survival was available for 32 patients (minimum=1, maximum=24, median=19 months). Metastases were found after surgery in 76% of these patients. Lymphocyte immunophenotype was determined by FACS analysis. The following were considered: CD16/CD56+ (natural killer); CD19+ (B lymphocytes); CD3+ (T lymphocytes), CD4+ (T helper), CD8+ (T cytotoxic). Results: Tumor stage did not correlate with lymphocytes immunophenotype or total lymphocyte count. CD16/56+ were lower in patients with (14.7% +1.14, mean +SE) than in those without lymphnode metastases (25.4% + 4.9)($t=9.83$, $p<0.01$). CD4+ were lower in patients with undifferentiated (47.6% +2.1) than in those with well differentiated PC (55.6% + 2.1)($t=2.65$, $p<0.05$). Tumor stage, not grade ($\chi^2=3.55$, p:ns), correlated with the development of metastases after surgery ($\chi^2=12.75$, $p<0.01$). Patients who developed distant metastases after surgery had also significantly lower levels of total lymphocytes (Mann Whitney $U=31.5$, $p<0.05$). Total lymphocyte count discriminated patients who developed from patients who did not develop distant metastases after surgery with a sensitivity of 75% and a specificity of 64% (cut-off=1.5 x 10^9/L). The overall survival of patients correlated with tumor stage (Log rank=12.4, $p<0.01$), but also with total lymphocytes (Log rank=16.5, $p<0.001$). The association between survival and total lymphocyte count was confirmed when stage III (Log rank=10.2, $p<0.005$) or stage IV patients (Log rank=3.0, $p=0.08$) were considered singly. Conclusions: The presence of lymphnode metastases at diagnosis or the development of metastases after surgery are significantly associated with a reduction of natural killer cells and total lymphocytes counts. A reduction in the latter at diagnosis could predict patients' survival, independenly from tumor stage.

157

EVALUATION OF AN ELISA METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTI-HSP60 AUTOANTIBODIES IN HUMAN SERUM

Giannessi D., Vitale R.L., Colotti C., Del Ry S., Passino C., Emdin M.

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa Italy.

Background: The Heat Shock Proteins (HSP) are families of proteins which are induced in response to many different stress conditions and their expression is essential for cell survival. HSPs, although normally localized within the cell, have been also found in human peripheral circulation and their presence, as well as that of their autoantibodies, is associated with different cardiovascular diseases. For this a methodological evaluation of an Elisa method for the quantitative determination of anti-HSP60 autoantibodies in humans has been made in order to use this determination as a risk factor for cardiovascular diseases.
Method: Anti-HSP60 autoantibody levels in serum samples were determined by a commercially available Elisa kit (Stressgen Biotechnologies). This method allows us to determine the concentration instead of the titer of anti-HSP60 autoantibodies in human serum (standard range 7.81-250 ng/ml).
Results: In our conditions, the working range (analyte determination with an imprecision lesser than 10%) resulted 11-250 ng/ml, as evaluated by the imprecision profile determined for each dose-response curve. Usually 1:500 dilution of unknown samples resulted suitable to assay. Sensitivity was 2.0 ± 0.20 ng/ml, mean ± sem; the between and the within-assay variability were 18.7 ± 0.46 (7.3%, n=9) and 18.3 ± 0.20 μg/ml (2.2%), respectively. Accuracy was evaluated by dilution and recovery tests: a parallelism of the response from 1 to 0.05 μl of serum and a quantitative recovery of the anti-HSP60 antibody standard preparation added to a 1:500 diluted sample ruled out any matrix effect. The mean value of anti-HSP60 antibodies in healthy subjects was 17.4 ± 2.8 μg/ml (range 4.6-55.1, n=22) while higher levels were found in a group of subjects with chronic heart failure: 25.6 ± 3.7 μg/ml (range 7.5-167, n=57, EF% <50).
Conclusions: The use of calibrated standard to built the dose-response curve allows a better definition of the autoantibody content in the unknown samples with respect to the evaluation of the titer by scalar dilution or the use of arbitrary units of antibody concentration. This method, for its low level of inter- and intra-assay variability as well as the lack of matrix effects, is suitable to reliably measure the anti-HSP60 antibody concentrations in human serum and to be used as a marker of risk in cardiac diseases.

Reference: XU Q. Role of Heat Shock Proteins in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22:1547-1559.

158

GLI ANTI ACTINA IgA NEL MORBO CELIACO, VALUTAZIONI METODOLOGICHE PRELIMINARI

Brusca I.#, Carroccio A§,.Pirrone A§,.Teresi S*,. La Chiusa S.M#

#Ospedale "Buccheri La Ferla F.B.F". Palermo, § Dipartimento di Medicina Interna Università degli studi Palermo, Dipartimento Materno-Infantile *Ospedale per Bambini "G. Di Cristina" Palermo

Background. Il morbo celiaco è una malattia sistemica autoimmune glutine -sensibile caratterizzata da lesioni istologiche della mucosa duodenale Sono stati recentemente descritti autoanticorpi sierici diretti contro i filamenti di actina (1), (AACT), la cui presenza è stata messa in correlazione al danno istologico. Scopo dello studio, non esistendo appositi kits commerciali è effettuare una valutazione preliminare delle problematiche riscontrabili nella ricerca e nel dosaggio di tali autoanticorpi in immunofluorescenza indiretta
Materiali e metodi. Sono stati esaminati 35 sieri provenienti da pazienti adulti e pediatrici, affetti da celiachia, da un gruppo di 30 volontari, clinicamente sani, EMA e TTG negativi;e da un gruppo di pazienti EMA e TTG negativi, DQ2, DQ8 negativi, affetti dalle seguenti patologie: 6 epatite autoimmune(EA), 4 cirrosi biliare primitiva (CBP), 10 con allergie alimentari. Per la ricerca sono stati inizialmente utilizzati come substrato vetrini di cellule HEP II normalmente in commercio(INOVA San Diego California) ed antisiero anti IgA fluoresceinato contenuto in un kit commerciale per la ricerca di anticorpi anti endomisio(A) (Eurospital, Trieste). Successivamente sono state utilizzate con lo stesso antisiero cellule HEPII diversamente fissate per meglio evidenziare l' antigene (HEP II actin , INOVA San Diego California). Infine le stesse cellule sono state cimentate con un altro antisiero anti IgA fluoresceinato (B) (goat anti human IgA, Biorad Italy).
Risultati. Utilizzando HEP II normali e l'antisero A gli AACT sono stati ritrovati in 11 dei 35 pazienti con titoli da 1:10 ad 1:80. 2/30 dei controlli sani erano positivi a titolo non superiore ad 1:10, 4/20 dei controlli patologici presentavano AACT con titolo fino ad 1:40. Con le HEp II actin ed antisiero A, i risultati erano rispettivamente i seguenti: 16/35 dei celiaci con titolo non superiore ad 1:80, 2/30 dei controlli sani con titolo tra fino ad 1:20, 5/20 dei controlli patologici con titoli fino ad 1:40. I quadri fluoroscopici risultavano più chiari e leggibili. Con le HEp II actin ed antisiero B, i risultati erano rispettivamente i seguenti: 31/35 con titoli fino ad 1:640, 3/30 dei controlli sani con titoli fino 1:20, 5/20 dei controlli patologici con titoli fino ad 1:40. **Discussione.** I dati ottenuti dimostrano che, in assenza di kits commerciali ottimizzati all'uso, la ricerca di AACT, pur promettente, richiede una accurata messa al punto del test. Per lo stesso motivo i risultati provenienti da diversi laboratori potrebbero presentare differenze significative.
1)(Clemente MG et al. Gut 2000; 47: 520-526)

159

UN CASO DI MIELOFIBROSI AUTOIMMUNE ASSOCIATA AD OVERLAP TRA SINDROME DI SJOGREN E LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Zabeo M., Barberis M., Longhi E., Dolci A.

Dipartimento di Patologia MultiMedica, Milano

Razionale: la mielofibrosi (MF) è una patologia cronica mieloproliferativa, caratterizzata da un'alterazione clonale ad eziologia sconosciuta di un precursore emopoietico multipotente (stem cell). Le alterazioni morfologiche del tessuto emopoietico in corso di MF coinvolgono l'intera cellularità emopoietica e si associano sia ad emopoiesi extramidollare che a fibrosi reticolare del midollo osseo. La MF è un riscontro rilevabile in corso di leucemie e di neoplasie del midollo osseo, ed è stata talora osservata in associazione a patologie autoimmuni, prevalentemente il lupus eritematoso sistemico (LES).
Scopo del lavoro: descriviamo un caso di sindrome di Sjogren che ha sviluppato un overlap con il LES ed un interessamento ematologico con mielofibrosi associata.
Metodologia: il caso riguarda una donna di 45 anni affetta dalla sindrome di Sjogren dal 2001, ricoverata nel nostro ospedale per un peggioramento delle poliartromialgie. Durante il ricovero esegue, oltre agli esami di routine: emocromo (XE2100 Sysmex Toah, Dasit, Milano), pannello completo di autoimmunità (Plato Menarini, Firenze): anticorpi anti-nucleo (ANA) ed anti double-strand DNA (dsDNA) in IFI; anticorpi anti SSa, SSb, RNP, Sm, Scl70 e Jo1; IgG ed IgM anti-Cardiolipina, tutti in ELISA con cutoff = 20UA. La paziente ha eseguito una biopsia osteo midollare (BOM) per confermare il sospetto diagnostico di MF.
Risultati: all'emocromo si riscontrano: WBC 2.2x109/L; RBC 3.79x1012/L, Hb 10.8 g/dL, Hct 31.1%; piastrine 105 x109/L. Gli autoanticorpi risultano: ANA >1:640, dsDNA positivo, SSa 128.8 UA, SSb 157.5 UA, RNP 42.5 UA, Sm 16.2 UA, Scl70 48.4 UA e Jo1 48.7 UA. La leucopenia e l'anemia sono di probabile origine autoimmune, come confermato sia dall'alta positività per ANA, dsDNA, SSa ed SSb che dall'ipergamma-globulinemia policlonale (27.7%) rilevata all'elettro-foresi delle sieroproteine. La- debole positività evidenziata per gli anticorpi anti-RNP, Scl70 e Jo1, in assenza di dati clinici di sclerodermia e miosite, induce il sospetto di una potenziale coesistenza di mielopatia autoimmune. La BOM ha evidenziato un incremento della cellularità emopoietica, rappresentata prevalentemente da forme immature di tutte le serie e un diffuso incremento delle fibre reticoliniche, non costituenti aree di fibrosi, dati compatibili con MF iniziale associata a patologia autoimmune. Dopo terapia steroidea si è osservata una remissione completa del quadro clinico.
Conclusione: la MF associata a patologia autoimmune mostra una prognosi più favorevole della MF idiopatica, per cui è necessario eseguire su tutti i pazienti con sospetta MF un pannello completo di autoimmunità.

160

COMPARISON OF METHODS FOR AUTOMATED EVALUATION OF HUMAN TISSUE tTG IgA and IgG ANTIBODIES TO COELIAC DIAGNOSIS

Sacchetti L°*.,Mellone M.C.°, Palmieri D.°, Zarrilli F.**, Salerno G.°, Petrone E.°°, Paparo F.°°, Troncone R.°°

°Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, * CEINGE-Biotecnologie Avanzate , Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II"; °°Dipartimento di Pediatria e Laboratorio Europeo per lo Studio di Malattie indotte da alimenti, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", * *Facoltà di Scienze, Università del Molise, Isernia.

Aim: Circulating antibodies against tissue transglutaminase (tTG) are a feature of coeliac disease. The aim of this study was to estimate automated methods for their evaluation in order to facilitate the diagnostic work-up of coeliac patients.
Methods: Three method/instrument combinations:
1) CeliAK human anti-endomysial antibodies (EMA; IgA+IgG)/TEK4) (from Alifax);
2) Eu tTG(IgA+IgG)/VELA (from Eurospital);
3) Celikey ™ tTG (IgA) and ReCombi tTG (IgG) (from Pharmacia Diagnostics S.p.A.)/TEK2 (from Alifax)
were evaluated in terms of analytical performances and diagnostic characteristics as applied to coeliac disease diagnosis in 58 coeliac and 35 disease control subjects.
Result: Analytical performance was satisfactory with all three method/instrument combinations, but:
a) the linearity range was lower than claimed by manufacturers;
b) the lowest drift was with VELA and TEK2(<10%), and with TEK4 (between 10 and 20%);
c) total imprecisions were <10% for tTG-IgA with all methods, and for AGA-IgG and tTG-IgG with TEK2. Areas under ROC curves ranged from 0.956 to 0.994 for tTG-IgA, from 0.750 to 0.911 for tTG-IgG.
Conclusions: The reproducibility and diagnostic performance of the automated analysis of tTG antibodies are appropriate for clinical purposes. This rapid, quantitative procedure could be used as a first level test for coeliac disease, followed by EMA analysis to confirm the result.
Reference: Troncone R., Maurano F., Rossi M., Micillo M., Greco L., Auricchio R., et al. "IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for coeliac disease". J. Pediatr. 1999; 134: 166-71.

161

EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON IFN-β SULLA PRODUZIONE DI IL-10 E IL-12 DA PBMNC IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA

[1]Postiglione L., [1]Ladogana P., [1]Di Spigna G., [1]Buonavolontà L., [1]Bruno E.M., [2]Carrieri P.B.
[1]Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano" [2]Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Napoli, "Federico II" , Napoli

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia cronica infiammatoria demielinizzante del Sistema Nervoso Centrale mediata da un meccanismo autoimmunitario delle cellule T verso le componenti mieliniche. Importante nell'eziopatogenesi della SM è il ruolo di alcune citochine quali l'IL-12 e l'IL-10. L' IL-12, citochina proinfiammatoria, svolge un ruolo critico nella SM inducendo la differenziazione delle cellule Thelper1 attraverso la produzione di IFN-γ da parte di linfociti e di cellule NK. I suoi effetti sono antagonizzati dall' IL-10, citochina antiinfiammatoria, che promuove l'espressione di segnali di sopravvivenza per i neuroni e per le cellule gliali inibendo gli effetti proapoptotici. E' stato dimostrato, in letteratura, un incremento dei livelli di IL-12 e IFN-γ nei pazienti affetti da SM, con un aumento del rapporto IL-10/IL-12.
In questo studio abbiamo analizzato la produzione di IL-12 ed IL-10 da PBMNC di pazienti affetti da SM in trattamento terapeutico con IFN-β.
Sono stati esaminati 10 pazienti affetti da SM trattati con 22 microgrammi di IFN-β per tre volte a settimana. Sono stati poi raccolti i campioni di sangue per la determinazione delle citochine, prima della terapia con IFN-&beta e, durante il trattamento, a 1, 2, 4, 6, 8 e 12 mesi. Sono state isolate le PBMNC e messe in coltura per 72 ore e poi i sovranatanti sono stati raccolti ed analizzati per IL-10 e IL-12 con metodica ELISA (R and D System).
La terapia con IFN-β induce un aumento della produzione di IL-10, mentre la produzione di IL-12 non subisce variazioni statisticamente significative, con conseguente incremento del rapporto IL-10/IL-12; tale effetto è limitato solo nei primi sei mesi di terapia.
In questo lavoro abbiamo esaminato la produzione di citochine da PBMNC per caratterizzare gli effetti della terapia con IFN-β sul circuito immunoregolatorio IL-10/IL-12 nella MS. I nostri dati indicano che il trattamento con IFN-β induce un aumento del rapporto IL-10/IL-12 limitato ai primi sei mesi di terapia. Ciò è dovuto principalmente ad un incremento della produzione dell'IL-10, con conseguenti effetti positivi sull'andamento della malattia. Resta da chiarire perché l'effetto dell' IFN-β abbia una durata limitata ai primi sei mesi di terapia. A tal riguardo stiamo valutando se tale effetto sia dovuto a meccanismi inibitori quali la presenza di anticorpi anti IFN-β. La valutazione della produzione di IL-10 e IL-12 appare essere un utile strumento diagnostico non solo nell'inquadramento della SM ma anche nel monitoraggio della terapia.

162

IMMUNOLOGIC CYTOKINES: CYTOFLUORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT EVALUATION**.**

Faricelli R., Di Mele A.L., Dadorante V., Troiano S., Filippi G., Dragonetti D., Peri F., Petruzzellis D., Rabottini S., Quaranta M., Martinotti S..

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Clinicizzato "SS. Annunziata", Chieti

AIM: Since inflammatory articular diseases have represented an ideal ground on which the role of cytokines in causing, or on the contrary in counteracting the development of such diseases could be studied, we addresses this issue assessing cytokines in pediatric chronic rheumatoid arthritis. For this type of disease the cytokines which we evaluated were: IL-2, rIL-2, IL-6 e TNF-α.
METHODS: All utilized reactants were from Farmigen BD. Readings were carried out using cytofluorimeter BD. The results were compared with the ones obtained using reactants Medical System with readings done using Immulite chemiluminometer.
RESULTS: Forty (40) samples from pediatric patients with rheumatoid arthritis were processed. Thirty-nine (39) patients were IL-6 negative and only one patient had high values with both methods. Instead, all 40 patients were TNF-α negative with both methods.

CYTOFLUORIMETER			
	IL-2	IL-6	TNF-α
POS	-	1	-
NEG	40	39	40
TOT	40	40	40

CHEMILUMINOMETER			
	rIL-2	IL-6	TNF-α
POS	36	1	-
NEG	4	39	40
TOT	40	40	40

Cytofluorimetric IL-2 40 negative results, while chemiluminescent rIL-2 dosing showed 36 positive results.
CONCLUSIONS: The data obtained show that:
- the two compared methods (cytofluorimetric and chemiluminescent) seem to have the same specificity and sensitivity;
- the maximum specificity for rheumatoid arthritis is given by the receptor for IL-2 (rIL-2);
- to the best of our knowledge, no literature data have been reported comparing these two methods (cytofluorimetric and chemiluminescent) for studying cytokines.

REFERENCES: Keystone E.C., Snow K.M., Bombardier C., Chang C.H., Nelson D.L., Eubin L.A.: Elevated soluble IL-2 receptor levels in the sera and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 31: 844-9, 1988.

163

SENSITIVITY OF ANTIENDOMYSIUM IgA ANTIBODY ASSAY IN COELIAC DISEASE. COMPARISON BETWEEN ADULT AND PAEDIATRIC POPULATIONS.

Antonacci M., Lauriola G., Casparrini G.

Clinical Pathology - IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza" - San Giovanni Rotondo (FG) – Italy

The availability of immunologic assays allows the identification of new cases of Coeliac Disease (CD) even in the absence of suggestive symptoms of the disease. The positivization of antiglyadin (AGA) and antiendomysium (EMA) antibody titers can precede or follow the histologic damage of duodeno-jejiunal mucosa. Together with the overt form of CD there are other CD forms as well. A silent CD characterized by absence of symptoms and subtotal atrophy of duodeno-jejiunal mucosa. A latent CD with inconstant or minor mucosal alterations and possible EMA titers positivity. A potential CD with positive, though weak, EMA titers and several immunologic, clinical and therapeutic aspects still to unravel. The present study is aimed to the evaluation of EMA sensitivity in CD, as compared to the others immunologic assays.

MATERIALS AND METHODS - We have considered a group of 118 CD children and 27 CD adults. AGA-IgA and AGA-IgG have been assayed by a immunoenzymatic method; EMA-IgA has been assayed by an indirect immunofluorescent method on monkey lower esophagus third. Biopsy has been performed on the second duodenal portion and CD diagnosed following ESPGAN criteria. Children with selective IgA deficit have been excluded from the study.
RESULTS - In paediatric group EMA at diagnosis were positive in 82 cases (69,5%), AGA-IgA in 99 cases (83,9%), AGA-IgG in 113 cases (95,8%). In adult group, however, EMA were positive in all cases (100%), AGA-IgA in 22 cases (81,5%), AGA-IgG in 25 cases (92,5%). In a single child EMA became positive later, the switch phase lasting few weeks and corresponding to the evolution towards subtotal atrophy of duodeno-jeiunal mucosa.
DISCUSSION - While AGA-IgA and AGA-IgG patterns are very similar in the two populations, EMA significantly ($p<0.001$) differs, being always positive at diagnosis in adults.
CONCLUSIONS - EMA sensitivity is significantly lower in children, as compared to adults. Furthermore, it seems that the time span of exposition to the gluten might be an important or even decisive element in the introduction of EMA positivization. The latter appear to be excellent predictor of histopathologic damage.

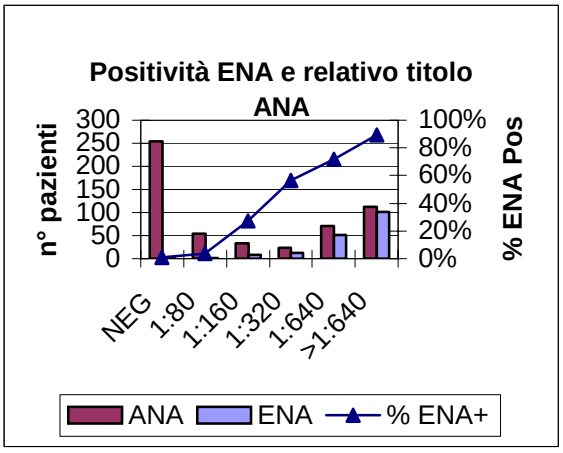
164

CORRELAZIONE TRA LA POSITIVITÀ DEL TEST ANA E LA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI-ENA.

Tampoia M., Zucano A., Fontana A., Agostini P., Pansini N.

Patologia Clinica I, Policlinico di Bari, Bari.

La correlazione tra la positività ANA e la presenza di anti-ENA è condizionata dal titolo degli ANA. **Scopo**: valutare la correlazione ANA-ENA su 572 pazienti ricoverati presso un reparto di alta specializzazione per la diagnostica delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS), pervenuti con richiesta congiunta di ANA ed anti-ENA. **Materiali e metodi:** la ricerca di autoanticorpi anti-nucleo è stata eseguita con metodica IFI su Hep-2 (EUROIMMUN) quella di autoanticorpi anti-ENA con metodica EIA (DIASTAT) relativamente agli antigeni SS-A, SS-B, SM, SM-RNP, Jo1, Scl-70. **Risultati : l**a ricerca sistematica degli anticorpi anti-ENA in tutti i pazienti analizzati, ha evidenziato che la percentuale di positività del test di II livello è stata del 55,6%. La valutazione condotta in relazione al titolo degli ANA ha evidenziato che la percentuale di anti-ENA in pazienti con titolo < 1 /160 è stata del solo 3.7%(grafico).



La positività anti-ENA è stata evidenziata in due pazienti ANA negativi (0,8%), entrambi anti-SSA, dei quali una affetta da S.Sjogren, clinicamente diagnosticata, l'altro affetto da patologia infettiva (endocardite batterica) **Conclusioni:** i dati ottenuti, attestano che la ricerca sistematica degli anticorpi anti-ENA con titolo ANA < 1/160 non dovrebbe essere effettuata e la decisione di eseguire un test di II livello in presenza di ANA negativo o a basso titolo deve essere comunque sempre basata su un consistente sospetto clinico di MAIS. **Bibliografia:**

Hamburger HA. Cascade testing for autoantibodyes in connective tissue diseases. Majoclin.Proc. 1995; 70:183-4

165

ANTICORPI ANTI-ANTIGENI NEURONALI E DIAGNOSTICA NEUROLOGICA

Bonaguri C.*, Aloe R.*, Battistelli L.*, Russo A.*, Rossi R.*, Antonelli M.J.°, Scoditti U.°, Monica C.*

*Dip. Diagnostica di Laboratorio , Az. Osp. Parma
°Dip. Neuro- Scienze , Az. Osp. Parma

Introduzione . Sempre più numerose sono le evidenze cliniche e sperimentali che depongono per una origine autoimmune di molte patologie neurologiche.
Le Sindromi paraneoplastiche rappresentano la manifestazione clinica di una risposta immune sfaccettata che si rivolge contro antigeni espressi da alcuni tumori e dal Sistema nervoso (antigeni onco-neuronali).
La definizione diagnostica delle patologie neurologiche presenta spesso difficoltà legate ad un quadro sintomatologico confondente. La ricerca degli anticorpi anti-antigeni neuronali può risultare, così, di grande interesse in termini di accuratezza diagnostica.
Nei pazienti affetti da Sindrome paraneoplastica gli anticorpi anti-antigeni neuronali possono essere rilevati nel siero e nel liquido cerebrospinale ; la metodica di elezione è l'immunofluorescenza indiretta su sezioni di cervelletto di primate.
Materiali e metodi. Lo studio ha preso in esame la storia clinica di una paziente di 63 anni afferita nel Gennaio 2003 alla Clinica Neurologica dell'Azienda Ospedaliera di Parma con una sintomatologia caratterizzata da instabilità ed acufeni . Il quadro clinico è peggiorato nei 6 mesi successivi con deterioramento cognitivo, diplopia e disartria di tipo cerebellare.
Risultati. L'esame RM cerebrale pur rilevando aree di alterato segnale non ha mostrato un quadro di demielinizzazione compatibile con diagnosi di Slerosi Multipla.
Negative sono risultate la ricerca per markers neoplastici (CA 15-3, NSE) e le indagini ecografiche, radiologiche e scintigrafiche per neoplasie occulte.
L'esame del liquor mediante immunofissazione su gel di agarosio (CSF-Sebia - Italia) ha rilevato 4 bande oligoclonali .
Gli anticorpi anti-antigeni neuronali sono stati saggiati su siero e su liquor con la tecnica dell'immuno-fluorescenza indiretta su sezioni di cervelletto di primate (IMMCO Diagnostics-Buffalo / Alifax-Italia).
L'indagine è risultata positiva sia su siero che su liquor per anticorpi anti-antigeni neuronali di tipo Hu.
La paziente è stata trattata seguendo il protocollo per le sindromi paraneoplastiche (steroidi a dosaggi terapeutici seguiti da un ciclo di immunoglobuline in vena)
A distanza di due mesi si è apprezzato un significativo miglioramento del quadro clinico.
Conclusioni. La ricerca di anticorpi anti-neuroni può effettivamente risultare dirimente in quadri neurologici di difficile definizione diagnostica .
Può essere, inoltre, di interesse studiare la possibile relazione fra espressione sierica e liquorale di anticorpi anti-neuroni e rilievo di bande oligoclonali nel liquor di pazienti affetti da sindrome paraneoplastica.

166

CITOCHINE INFIAMMATORIE IN PAZIENTI CON SEPSI.

Metelli M.R., Cecchetti F., Fulceri F., Manzone F., Puccetti C., Panicucci E., Giunta F. °, Pietrini P..

U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate, °U.O. Anestesia e Rianimazione IV, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana

Nella sepsi i comuni parametri chimici di laboratorio mancano di specificità e di sensibilità, sono quindi necessari altri marker che provvedano a fornire una diagnosi precoce per facilitare un più specifico e tempestivo intervento terapeutico o che servano per la valutazione del decorso clinico, data la morbilità e la mortalità sempre presente, legata a tale evento patologico ed alle sue complicanze. La scoperta delle citochine quali responsabili dell'induzione delle proteine della fase acuta ha aperto la via ad importanti applicazioni in campo diagnostico e terapeutico. Lo scopo del presente studio è indirizzato alla ricerca di modificazioni significative nell' espressione di alcune citochine tali da permettere la loro utilizzazione come marker precoci di infiammazione e di danno tissutale, in pazienti che presentano quadri clinici molto complicati. Lo studio è stato condotto su campioni di sangue ottenuti da 20 pazienti di età compresa tra 21 ed 83 anni (56 ± 22, media ±SD), ricoverati nel reparto di Rianimazione per sepsi. I prelievi di sangue sono stati eseguiti al momento dell'arrivo al reparto e nei giorni successivi per il periodo di degenza in tale reparto, in momenti diversi della giornata. I campioni biologici sono stati conservati, dopo opportuna separazione, a -20°C sino al momento del dosaggio. Sono state testati i livelli di IL-6, TNF-α, TNF-RI , TNF-RII con metodiche ELISA (Technogenetics s.r.l.). I pazienti in studio sono stati ulteriormente suddivisi in due gruppi in base alla diversità nella risposta alla sepsi. Il gruppo A comprendeva 15 pazienti che sono andati incontro a risoluzione della sepsi durante il ricovero. Il gruppo B includeva 5 pazienti andati incontro ad exitus per complicanze. I dati valutati hanno evidenziato una significativa differenza dei livelli di concentrazione per l' IL-6 ed il TNF-α, tra inizio e fine del periodo di monitoraggio, nei pazienti del gruppo A (mediana 762 e 62 pg/ml, test Wilcoxon = 3.095, p = 0.002) e (mediana 52 e 30 pg/ml, test Wilcoxon = 2.357, p = 0.02) rispettivamente, mentre i livelli di IL-6 e TNF-α si mantengono pressoché costantemente elevati nei pazienti del gruppo B (mediana 282 e 330 pg/ml, test Wilcoxon = 0.809, p = 0.418) e (mediana 84 e 78 pg/ml, test Wilcoxon = 0.417 , p = 0.676). I dati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra l' inizio e la fine del monitoraggio per il TNF-RI ed il TNF-RII nei due gruppi di pazienti esaminati.Questi primi risultati suggeriscono che l' IL-6 ed il TNF- α possano essere utilizzati come parametri attendibili per caratterizzare la risposta immunitaria, i dati infatti mostrano una buona correlazione con l'ampiezza della risposta immunitaria e la severità della malattia.

167

CYTOKINES LEVELS IN BREAST CANCER PATIENTS WITH AND WITHOUT METASTASES.

Metelli M.R., Manzone F., Fulceri F., Ferrari P., Pietrini P., Panicucci E..

Laboratory of Clinical Biochemistry, Departement of Experimental Pathology, University of Pisa, Italy.

Cytokines constitute a complex network of small, secreted proteic mediators which act on cells through high-affinity receptors.The majority of cytokines has a variety of effects on many different cells. Several cytokines, generally considered relevant only to the immune and haematopoietic systems, were shown to be expressed also by solid tumours. As matter of facts, increased blood levels of IL-2, IL-2R, IL-6,IL-12 have been found in patients with different types of cancer. The role of these cytokines in patients with breast cancer has not been determined yet. The aim of the present study was to assess whether those factors differed between breast cancer patients with active disease and breast cancer patients in remission. We measured plasma concentrations of IL-2, IL-2R, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 in 61 patients with breast cancer (mean age 60 ± 11 SD years): 20 patients were under treatment for metastases with partial or complete response, 41 patients had been disease-free for at least 36 months. Cytokines in the patients were determined repeatedly over a one-year period including treatment-free periods. Blood samples were drawn in the morning, and plasma was stored immediately at -20°C. Plasma concentrations of these cytokines were determined quantitatively by enzyme-linked immunosorbent assay (Technogenetics s.r.l.). IL-6 and IL-2R levels were significantly higher in the 20 patients with metastases than in the 41 disease-free patients (6.2 vs 4.2 pg/ml, Un-paired t test = 2.288, p = 0.025) and (12.6 vs 3.7 ng/ml, Un-paired t test = 3.627, p = 0.0006) to the study start (To) and (7.7 vs 3.2 pg/ml, Un-paired t test = 3.195, p = 0.002) and (10.6 vs 3.9 ng/ml, Un-paired t test, p < 0.0001) to the end the study period (T*f*), respectively. IL-12 levels, although still within in the "normal" range, were significantly higher in the patients with metastases at To but without any difference at T*f*. No significant difference was seen in IL-2, IL-4 and IL-10 levels. These findings, although preliminary, show that IL-6 and IL-2R are elevated in metastatic breast cancer patients and suggest that levels of these cytokines may be a valuable parameter of metastatic disease and may be of help in monitoring disease activity in breast cancer patients.

168

CORRELAZIONE DI DUE METODICHE RF E WR PER LO STUDIO DELL' ARTRITE REUMATOIDE

Loiodice L.; Di Serio F.; Girone E.; Fontana A.; Tampona M.; A. Colacico; A. Verna; Varraso L.; Agostini P.; Lovero R.; Pansini N.

Laboratorio Patologia Clinica I Policlinico Bari

Il Fattore Reumatoide è una immunoglobulina IgM e più raramente IgG , Ab diretto contro una immunoglobulina IgM (self) ed è presente nel 70% dei casi di artrite reumatoide : il test può risultare negativo nell'A.R. giovanile , ma può essere positivo in malattie infiammatorie, autoimmuni e neoplastiche. La Waaler Rose è un Ab antiIgG di coniglio positiva nel 65% dei casi di A.R ed a basso titolo in malattie epatiche o flogistiche . **Scopo del lavoro**: valutare la specificità e la sensibilità, la linearità e la precisione delle metodiche: nefelometrica per il dosaggio dell' RF ed emoagglutinazione con emazie sensibilizzate di montone per la WR. **Materiali e metodi**: per l'RF è stato utilizzato il reattivo N Latex RF(Dade Behring) con metodica immunochimica applicata allo strumento BN2, per la WR è stato utilizzato il kit con metodica manuale o automatizzabile per l'emoagglutinazione (Bouty). Sono stati considerati 431 pazienti , i cui campioni sono stati testati nell'arco di 3 mesi da settembre '03 a novembre '03 , per RF e WR, e sono stati riscontrati : 354 negativi (RF < 15 U.I./ml e WR < 16 U.I./ L) ; 57 positivi per RF e negativi per WR ; 18 positivi sia per RF che per WR ; 2 negativi per RF e positivi per WR. **Risultati**: in una casistica di pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali sono state rilevate le seguenti percentuali: RF e WR negativi = 82.1 % ; RF positivi e WR negativi = 13.22 % ; RF positivi e WR positivi = 4.17 % ; RF negativi e WR positivi = 0.46%. **Discussione**: l'interpretazione dei casi con valori di RF positivi e con WR negativa è stata possibile considerando le ulteriori indagini richieste sia dai reparti che ambulatorialmente per la diagnosi di patologie autoimmuni, neoplastiche e di epatopatie. Sono state calcolate la specificità e sensibilità delle due metodiche considerando i veri positivi, i veri negativi, i falsi positivi e falsi negativi dei due test.

VP=20 FN=0 Sensibilità RF =100%	VP=20 FN=0 Sensibilità WR = 100%
FP=57 VN=354 Specificita' RF = 89%	FP = 2 VN=354 Specificità WR = 99%

Il coefficiente di correlazione e il livello di probabilità con la correlazione di Pearson relativi a n. 77 casi (totale positivi per RF e /oWR) sono: **r statistic** = 0,67 e **2-tailed p** < 0.0001. Il confronto tra la regressione polinomiale e la regressione di Deming identificano la stessa linearità con R^2=0.44, p<0.0001 e rispettivamente con y = 0.1854x + 0.7867 e y = 0.1934x-0.0053(rette allineate).

Conclusioni: i test RF e WR sono sovrapponibili, escludendo i falsi positivi, non solo nell'interpretazione, ma anche nelle correlazioni e regressioni . Pertanto la loro interscambiabilità non dovrebbe creare difficoltà diagnostiche.

169

COMPLEMENT SYSTEM DURING DELIVERY IN A HEREDITARY ANGIOEDEMA PATIENT AND IN HER NEWBORN.

Ballerini S.[1], Guarino M.D.[1], De Carolis C.[2], Perricone R.[1], Calugi A.[3], Malerba C.[3], Infantino M.[1], Bernardini S.[1], Federici G. [1]

[1]Dept. of Internal Medicine-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy
[2]ASR RMC, Rome, Italy
[3] Dept of Surgery, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy

Background: Hereditary angioedema (HAE) is an autosomal dominant disorder in which underlying quantitative and/or functional deficiency of complement C1 inhibitor (C1INH) and, in turn, chronically deteriorating complement function are observed (1). Since attacks often occur during delivery, we report here clinical and laboratory findings in a 30 years old woman previously diagnosed by us for HAE followed throughout parturition (caesarean section) and in her newborn.

Methods: CH50 was studied according to Mayer. C1 INH concentration was studied by means of radial immunodiffusion. C3 and C4 levels were measured with immunoturbidimetric assay. Functional C1 inhibitor was studied by means of heterolysis of C_2H_5CO-Lys(ε-Cbo)-Gly-Arg-pNa assay.

Results: We found low levels of C1INH and C4 in the baby with values suggesting the diagnosis of HAE whereas the diagnosis of HAE was confirmed in the mother. In addition, an HAE attack occurred during and soon after delivery, therefore we treated promptly the patient with 1,000 I.U. of purified C1INH e.v. right after the delivery. At the same time we could see that mother's CH50 values were increased, as well as C1 INH values.

Conclusions: Complement monitoring during delivery confirmed the diagnosis of HAE in the mother and allowed neonatal diagnosis in the baby. The increase of C1INH value, observed after delivery, is a direct effect of C1INH infusion itself. On the other side, the increase of CH50 value after delivery can be explained as a possible result of the phenomenon called "reactive lysis".

1) R. Perricone, C. De Carolis et al. Impared Human follicular complement Funcion in Hereditary Angioedema. Scand. J. Immunol. 51, 104-108, 2000.

170

ANA SCREENING: COMPARISON BETWEEN ELISA (NUCLEAR HOMOGENATES, PURIFIED OR RECOMBINANT ANTIGENS) AND IFI

Infantino M.[1], Bernardini S[1].,Ballerini S. [1],Nuccetelli M.[1],Bellincampi L. [1] ,Rapanotti C. [1], Afeltra A.[2], Iori R.[1], Cortese C.,[1] and Federici G. [1,3]

[1]Dept. of Internal Medicine-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy
[2]Campus-Biomedico, Roma-Italy
[3]Bambino Gesù-IRCCS Hospital Rome, Italy

The current clinical practice, which consider ANA testing as a screening test, has a major impact on laboratory work, with a groving volume of analysis that need to be performed rapidly mantaining sufficient specificity and sensibility and raises a sustained discussion about the choise of technology, both for clinical and economical implications.
The aim of our study was to compare three generation ELISA, based on nuclear homogenates from HeLa cells, purified antigens from HEp-2 cells and recombinant antigens respectively, with immunofluorescence assay to understand which is the best to use as screening test.
The study has been performed on 495 sera.
The clinical specificity of ANA determination was tested in 180 control subjects using the "cut off"values recommended by manufacturer ad we obtained the following data: 92% for the 1ºgeneration ELISA, 70% for the 2ºgeneration ELISA, 95% for the 3ºgeneration ELISA ad 86% for IFI-ANA 1:80 (tab.1).
The concordance between the ELISAs and IFI-ANA techniques, determined by the k statistic, was accettable but not complete and discrepancies between both ELISA positive/IFI negative samples as well as for the reverse were found (1ºgeneration ELISA k= 0,51 p_o 0,80 p_e 0,59, 2ºgeneration ELISA k = 0,47 p_o 0,75 p_e 0,53, 3ºgeneration ELISA k = 0,53 p_o 0,82 p_e 0,62)
ANA-IFI test seems to be the first choice test; on the other hand the ELISA test might be a good diagnostic tool especially in the presence of a very large ANA screening.
At the end we compared manufacture's cutoff values of three different generations of ELISA kit with our experimental values obtained by ROC curves.
We have found similare results for both first and second generation kit (1,1/1.01 1st.gen.; 1.1 vs. 1.2 2nd gen.),whereas third generation showed lower values. (1.4 vs.0.8 3rd gen.)
1)Griesmacher A, Pichl P. Clin Chem Lab Med 20 01;39(3):189-208.

Tab.1-Ana sensitivity in different diseases:

	1ºgeneration ELISA	2ºgeneration ELISA	3ºgeneration ELISA	IFI-ana 1:80
SLE (55)	87%	89%	78%	91%
SS (13)	69%	69%	44%	54%
SScl (25)	68%	80%	69%	64%
AR (22)	41%	55%	27%	32%

171

RUOLO DELLE PENTRASSINE LUNGHE (PTX3) NELLA RISPOSTA DI TIPO ALLERGICO.

Lanzano R.*,Conti A.**,Ricciardone M.**,Lanzano G.*,Altamura S.**and Postiglione L:**

Dipartimento di Medicina Sperimentale"F:Magrassi"-Seconda Università di Napoli- Facoltà di Medicina e Chirurgia. **Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare"L.Califano".Università dedli Studi di Napoli "Federico II"Fac.Medicina e Chirurgia

Le Pentrassine lunghe (PTX3 o TSG14) sono molecole del sistema immunitario innato prodotte da cellule dell'endotelio vasale e da macrofagi e cellule dendritiche ed in particolare entrano nel meccanismo di amplificazione e di regolazione dell'infiammazione essendo indotte da segnali infiammatori primari come la interleuchina 1 e il TNF e da prodotti di alcuni funghi e batteri legando il C1q,primo componenete della cascata del complemento.Sono complessi proteici circolanti di P.M di circa 43 kDa costituiti da una catena di 364 aa., presenti in forma solubile nel sangue,nel liquido degli alveoli polmonari,nel plasma seminale e nel liquido follicolare ed in tutti gli altri liquidi biologici.
Scopo di questo lavoro è cercare un loro ruolo nella risposta ai fenomeni infiammatori su base allergica ed il loro eventuale utilizzo come markers in tali patologie.
Abbiamo,dunque,correlato i valori della PTX3 ,ottenuti testando il siero di 100 pazienti pervenuti nei nostri centri,di cui 80 con una diagnosi di sospetta allergia e 20 con assenza di tale patologia,con i valori delle IgE Totali e della CRP ottenuti .
Il dosaggio delle IgE Totali è stato eseguito con metodica FEIA (UNICAP-Pharmacia,Uppsala-Sweden) , Il dosaggio della Proteina C-Reattiva è stato eseguito con metodica nefelometrica (BN II-Dade-Behring,Marburg-Germany).Il dosaggio della PTX3 o TSG14 è stato eseguito con metodica ELISA (Alpha Diagnostic International Inc.,San Antonio- Usa).
I risultati sperimentali ottenuti, relativi ai dosaggi dei tre parametri su citati, indicano che il 12% dei campioni testati presenta un aumento della sola PTX3,che il 7% mostra un contemporaneo aumento di PTX3 e di IgE Tot.,che il 4% mostra un contemporaneo aumento di PTX3 e CRP,che il 3% mostra un aumento contemporaneo di tutti e tre i marcatori e che il 74% ha un andamento non correlabile dei tre parametri.
I risultati derivati da questo studio preliminare sembrano non mostrare l'esistenza di una correlazione fra livelli di IgE Totali, PTX3 e CRP in pazienti allergici e che quindi la PTX3 non può fungere da marcatore diagnostico nella risposta di tipo allergico.

172

CLINICAL LABORATORY INVESTIGATION IN CELIAC DISEASE

[1]Liberatoscioli L., [1]Infantino M., [1]Cortese C., [1,2]Federici G. and [1]Bernardini S.

[1]Dept. of Laboratory Medicine, University Hospital "Tor Vergata" Rome, Roma,
[2]Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Laboratory of Clinical Biochemistry, Rome.

Celiac disease (CD) is a syndrome characterized by damage of the small intestinal mucosa caused by the gliadin fraction of wheat gluten and similar alcohol-soluble proteins (prolamines) of barley and rye in genetically susceptible subjects.
The first serologic marker reported to be of use in the diagnosis of celiac disease was the IgG class antigliadin antibody (AGA), a positive IgG and IgA. AGA gives a reported sensitivity of 96 % to 100 % and specificity of 96 % to 97 %.
Recently, two antibodies, IgA class antiendomysial antibody (EMA) and human jejunal antibody (JAB), have been identified to be highly sensitive and specific for active celiac disease (A. Carroccio et al., Clinical Chemistry 2002). The one best characterized is the EMA, an antibody against endomysium reticulin fibers. The endomysial antigen was identified recently as the protein cross-linking enzyme known as tissue transglutaminase (tTG). Laboratory tests are used to corroborate suspicion of CD but the diagnosis requires tissue biopsies taken from small intestinal lesions to show histological abnormality before treatment, and a rapid clinical improvement on a gluten free-diet.
The human leukocyte antigen genes encoding class II molecules DQ2 and DQ8 has been identified as key genetic risk factors in CD.
We performed serological tests and HLA typing on 602 out-patients at the Policlinico Tor Vergata (PTV), Rome.

For 84 patients, followed by pediatric department of PTV, a diagnosis of CD was made; 90% of these patients have HLA-DQ2 or DQ8 haplotype encoded by A1*0501 B1*0201, A1*0201 B1*0202 and B1*0302. 10% are negative for both HLA-DQ2 and DQ8 even if serological test are positive. Moreover, we verified an increased sensitivity of transglutaminase (tTG) autoantibodies compared to the IFI results of endomysial antibodies.

173

"RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DI ANTICORPI IRREGOLARI : METODICA CELLBIND "

M.A. Stigliano, M.C. Herzog , A. Papini, A. Carniato

U.O. Centro Trasfusionale Ospedale S. Giacomo Roma

Premessa : Da circa 4 anni nel nostro Centro Trasfusionale la metodica di riferimento per la ricerca di anticorpi irregolari è l'agglutinazione su colonna con microsfere di silice della Ortho Bio Vue System cards a 3 cellule . Il principio della metodica in microcolonna (schedina) è quello di intrappolare eventuali agglutinati dopo una sedimentazione standardizzata di una miscela siero-emazie utilizzando opportuni mezzi fisico-chimici,che esercitano un'azione di filtraggio con il compito di trattenere,in superficie o all'interno del mezzo, gli agglutinati e di lasciar passare le emazie libere.

Della tecnica "in schedina" esistono, sul mercato, due modelli :in quello apparso cronologicamente per primo, la reazione di agglutinazione avviene in micropozzetti (contenuti nella schedina di plastica) nei quali sono incorporate microsfere di gel di destrano (gel-filtrazione), mentre il secondo modello si avvale di microparticelle di silice (agglutinazione su colonna) presenti nei micropozzetti,che contengono il siero antiglobuline umane.

I campioni risultati positivi sono stati sottoposti ad identificazione con la metodica Cellbind CLB Amsterdam, The Netherlands (Menarini) a 16 cellule. Nel corso dell' anno 2003 su un totale di 1350 campioni analizzati 90 sieri sono risultati positivi con il metodo di agglutinazione su colonna della Ortho. Per la successiva identificazione abbiamo utilizzato la metodica Cellbind. Essa ha evidenziato i seguenti anticorpi irregolari: 65 anti-D , 12 anti- Lewis a, 7 anti-Lewis b, 3 anti-Kell ,1 anti-Duffy a , 1 anti-c , 1 anti-cw .
Conclusioni : Si evince pertanto la necessità di far precedere all'identificazione specifica degli anticorpi con una metodica a 16 cellule, lo screening a tre cellule che permette quindi una ricerca più semplice e più rapida degli eventuali anticorpi irregolari.

174

DOSAGGIO DI ANTICORPI IgA ANTI-TRANSGLUTAMINASI UMANA RICOMBINANTE (Eu-tTG® IgA) IN UN CAMPIONE DI SIERI DELLA PROVINCIA DI SASSARI

Tamponi A.[1], Ginanneschi R.[1], Errigo A.[2], Carru C.[2], Deiana L.[2], Pes G.M.[2], Pettinato S.[1]

[1]Laboratorio Medicina di Base, ASL n. 1 – Sassari
[2]Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari

La diagnostica di laboratorio della malattia celiaca (MC) si avvale attualmente della ricerca nel siero degli anticorpi anti-transglutaminasi umana tissutale (tTG), enzima intracellulare calcio-dipendente coinvolto nella immunopatogenesi della malattia. Da alcuni anni sono disponibili in commercio kit ELISA per il dosaggio degli anticorpi specifici IgA contro la tTG, con prestazioni analitiche particolarmente soddisfacenti. Obiettivo della presente indagine è quello di accertare la prevalenza di positività per anticorpi IgA anti-tTG in un campione di sieri della provincia di Sassari (area caratterizzata da una incidenza di MC più elevata rispetto a quella di altre regioni italiane). Sono stati analizzati in totale 822 campioni di siero inviati al laboratorio di Medicina di Base di Sassari nel corso dell'anno 2003 e provenienti da pazienti con sospetto clinico di MC. I campioni di siero sono stati suddivisi in base al sesso dei pazienti (M=267; F=555) e per classi decennali in base all'età. La determinazione semi-quantitativa degli anticorpi IgA è stata effettuata mediante kit immunoenzimatico in colorimetria Eu-tTG® IgA (Eurospital, Trieste). I risultati ottenuti sono i seguenti:

Età (anni)	Totale (N.)	Negativi (%)	Dubbi (%)	Positivi (%)
0 – 10	246	94,3	3,7	2,0
11 – 20	114	90,4	6,1	3,5
21 – 30	141	89,4	4,3	6,4
31 – 40	107	93,5	0,9	5,6
41 – 50	90	95,6	2,2	2,2
> 50	197	94,4	1,5	4,1

I campioni positivi (≥ 7,0 AU/ml) al test sono stati successivamente confermati mediante biopsia duodenale e rappresentavano il 3,5 % del totale con un rapporto F/M pari a 3,8. Questi dati preliminari confermano quindi l'importanza del dosaggio immunoenzimatico degli anticorpi IgA anti-tTG in una popolazione, quale quella sarda, ad elevata incidenza di MC.

175

AUTOMATED CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY FOR DIRECT RENIN AND ALDOSTERONE

Iervasi A, Emdin M, Passino C, Masini S, Turchi S, Zucchelli GC

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Radioimmunoassay (RIA) of Plasma Renin Activity (PRA) and aldosterone have been widely adopted in clinical practice to assess the renin-angiotensin-aldosterone system. PRA assay, however, is influenced by temperature of sample preparation and by changes in angiotensinogen concentration, while aldosterone is affected by scarce precision in the low range of concentration. To overcome these analytical problems a fully automated chemiluminescent immunoassay (CLIA), recently proposed by Nichols Institute Diagnostic to assay both direct renin and aldosterone, has been here evaluated. Direct renin CLIA was compared with direct renin IRMA (Pasteur, Bio-Rad) and with PRA obtaining the following regression: CLIA=18.7+1.04IRMA, r=0.96, n=86, p<0.001 and CLIA=-10.8+31.9PRA, r=0.91, n=347, p<0.001. Normal ranges calculated in healthy subjects were: 15±11 μU/mL direct renin CLIA (n=37); 10±8 μU/mL direct renin IRMA (n=25); 0.52±0.35 ng/ml/h PRA (n=54). Aldosterone CLIA was compared with aldosterone RIA (DiaSorin) obtaining: CLIA=-53.9+0.77RIA, r=0.93, n=110, p<0.001.
The analytical performances of direct renin CLIA were carefully analysed. Within-assay imprecision, n=22, gave at 5 μU/mL a CV=6%; at 34 CV=2% and at 195 CV=2%. Between-assay imprecision, n=20, gave at 5 μU/mL a CV=12%; at 32 μU/mL a CV=9%, at 90 μU/mL a CV of 8%, at 197 μU/mL a CV=6%. Dilution tests on 2 pools at 100 and 400 μU/mL gave a recovery of 92-109%. Concerning clinical performance of direct renin CLIA 150 patients with heart failure were analysed and divided into 2 groups: 92 patients with mild heart failure (NYHA classes I-II) and 58 patients with severe heart failure (NYHA classes III-IV) and tested by ROC analysis. Univariate logistic regression analysis gave significant levels (p<0.01) for direct renin CLIA, PRA and aldosterone RIA. In both groups of patients direct renin CLIA resulted a good predictor of heart failure as PRA. In particular for mild heart failure areas under the curve (AUC) were: PRA=0.733 (95% CI 0.635-0.827), direct renin CLIA=0.671 (95% CI 0.554-0.771), aldosterone=0.789 (95% CI 0.699-0.868). Severe heart failure: PRA=0.855 (95% CI 0.771-0.931), direct renin CLIA=0.792 (95% CI 0.684-0.881), aldosterone=0.801 (95% CI 0.692-0.889). Comparison between AUC of PRA and direct renin CLIA in both group of patients were not significant (p>0.05).
In conclusion direct renin CLIA showed very good analytical and clinical performance while preliminary results on aldosterone assay showed a substantial underestimation as compared with RIA values.

176

INSULINA: CONFRONTO METODICHE IRMA vs IMMULITE CROSSREATTIVITA' CON PROINSULINA?

Borghi M.F., *Zavaroni D.

U.O. Medicina Nucleare Osp. G. da Saliceto
U.O. Diabetologia Ospedale G. da Saliceto AUSL Piacenza

Un'iperproinsulinemia, conseguente ad una alterazione dei meccanismi di secrezione e processazione della Proinsulina ad Insulina, puo' essere presente nel Diabete Mellito tipo2 associato ad obesita' ed anche in diverse situazioni cliniche ed interferire con il dosaggio dell'Insulina. La metodica Insulina IRMA (Sanofi Pasteur) utilizza 2MAb con nessuna crossreattivita' per Proinsulina intatta e des 32-33 Proinsulina ed una crossreattivita' del 100% per des65,66 Proinsulina. La metodica Immulite (DPC) ha una crossreattivita' dichiarata per Proinsulina di 11.9% ma non dice niente sulla Proinsulina parzialmente processata. La metodica IRMA ha una sensibilita' funzionale di 0,5μU/ml, mentre la metodica Immulite ha una sensibilita' analitica di 2μU/ml Abbiamo dosato l'Insulina in 24 campioni provenienti da 6 curve da stimolo con pasto misto di pazienti obesi (BMI>27) affetti da Diabete Mellito tipo2 da piu' di 10 anni ed in terapia con ipoglicemizzanti orali utilizzando entrambi i metodi. La media dell'Insulina IRMA era 6.25 μU/ml ± 4.8DS mentre la media Insulina Immulite era 13.33 μU/ml ± 7.57DS. Abbiamo avuto una r=0.9671 ed un confronto tra medie(t-Student) p=0,00041 significativo. I valori dell'Insulina Immulite sono piu' elevati rispetto all'Insulina IRMA. Abbiamo supposto che l'Insulina Immulite abbia crossreattivita' per tutti i frammenti di Proinsulina parzialmente processata. Abbiamo dosato la Proinsulina (Linco Research Inc. crossreattivita' per Proinsulina des 32,33 95%) con metodica RIA negli stessi campioni su cui era stata dosata l'Insulina ed abbiamo poi sottratto al valore dell'Insulina Immulite il valore della Proinsulina intatta e della des 32,33 Proinsulina e poi abbiamo confrontato i dati cosi' ottenuti con i valori dell'Insulina IRMA ottenendo (t-Student) una r=0.43 non significativo.
La possibilita' che i livelli di Insulina, in diverse condizioni patologiche, siano "inquinate dagli split e des di Proinsulina richiede che il laboratorio ed il clinico debbano sapere a quale specificita', soprattutto riguardo alla interferenza con Proinsulina parzialmente processata, il dosaggio si riferisca.
L'Insulina con metodica Immulite presenta una crossreattivita' per tutti i frammenti della Proinsulina per cui, quando sussista il sospetto diagnostico di iperinsulinismo, e' importante dosare separatamente Insulina e Proinsulina e sottrarre quest'ultima dal valore della prima per ottenere un piu' corretto valore di Insulina "vera".

177

IL PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B (BNP) UN'ESPERIENZA NELL'AREA FIORENTINA

Lazzerini S., Martelli C., Minneci S.*

Laboratorio Chimica Clinica – *Ambulatorio Scompenso Cardiaco
Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio, Firenze

Lo scopo del nostro studio era quello di valutare la performance analitica di un immunodosaggio in chemioluminescenza diretta a due siti (sandwich), completamente automatizzato (ADVIA Centaur BNP – Bayer Diagnostics), per il BNP- 32, il peptide C-terminale a 32 aminoacidi fisiologicamente attivo che si forma dopo la scissione del pre ormone proBNP (un peptide a catena singola di 108 aminoacidi).
La popolazione presa in esame è stata di 425 soggetti (310 Maschi e 115 Femmine), in particolare 131 (103 M e 28 F) donatori di sangue con assenza di sintomi o segni di problemi cardiaci provenienti dal Centro Trasfusionale del Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio (gruppo di controllo) e 294 (207 M e 87 F) pazienti con scompenso cardiaco (CHF) distribuiti nelle varie classi NYHA provenienti dall'Ambulatorio Scompenso Cardiaco dello stesso ospedale.
Il BNP-32 è stato dosato con un metodo completamente automatizzato usando uno strumento Centaur (Bayer); abbiamo testato in ogni seduta analitica tre livelli di controllo, sia all'inizio che alla fine.
I campioni sono stati raccolti in provette di plastica contenenti EDTA; tutti i campioni sono stati testati in doppio.
Nel gruppo di controllo abbiamo ottenuto i seguenti dati: 131 soggetti (103 M e 28 F); età media 42.5 anni (range 18-65 anni); valore medio 13.8 pg/mL; mediana 11 pg/mL; 97.5° percentile 49.8 pg/mL.
Nel groppo dei pazienti abbiamo ottenuto i seguenti dati: valore minimo 0 pg/mL; valore massimo 4808 pg/mL; valore medio 368.5 pg/mL.
Imprecisione: controllo basso (Media 45.57 pg/mL; SD 2.172; CV 4.8%), controllo medio (Media 441.33 pg/mL; SD 15.568; CV 3.5%), controllo alto (Media 1715.69 pg/mL; SD 50.216; CV 2.9%).
Il nostro studio indica che ADVIA Centaur BNP può essere inserito senza problemi in un sistema dove vengono già eseguiti altri immunodosaggi, senza dover cambiare l'organizzazione del lavoro.
Questo metodo deve essere usato come test di routine; il BNP è utile sia nella diagnosi di CHF che nel differenziare problemi polmonari dal CHF stesso.
Il BNP fornisce un indice per la modulazione del trattamento dei pazienti con CHF ed è un valido marker per la prognosi.
Bibliografia: Suzuki T. e coll. (2001) ; Clerico A. e coll. (2000) ; Chen HH e coll. (2000) ; Kelly R. e coll. (2001)

178

INFLUENCE ON IMMUNOCHEMICAL TESTS AT LOT CHANGE DUE TO INTERNAL QUALITY CONTROL MATERIAL MATRIX

Bettinardi N., Repetto I.*, D'Ettorre M.

Clinical Pathology Lab. Sesto S. Giovanni Hospital, Sesto S. Giovanni (Mi), *Mathematics Department, Genoa University, Genoa (Italy)

Background Internal Quality Control (IQC) practices, requested by national and regional regulations, provide a continuous investigation and refinement of analytical processes and allow for validation of patient test results. The main features of any material used for IQC is its ability to reflect deviations from stable analytical performances. However, data obtained from commercial IQC materials may show important variations at assay reagent lot change, due to different matrices used. IQC materials for serum analyses with composition close to genuine serum are usually more reliable than artificial materials or materials with non-human constituents added, due to a better commutability.
Purpose: To evaluate if the use of a different matrix in IQC materials affects assay results in relation to reagent lot change.
Method: Two different IQC materials, at two concentration levels, have been assayed with the same immunoassays for FT3, FT4 and TSH. For about 8 months IQC data have been collected with Lyphochek Immunoassay Plus Control (BioRad Laboratories Srl, Segrate, Italy) prepared from human serum with added constituents of human and animal origin, pure chemicals and therapeutic drugs. Then, for 8 months more, IQC data have been collected with DicoCARE CQI Tiroide (Care Srl, Genoa, Italy) prepared from human serum. During the evaluation, from 5 to 8 different assay reagent lots were used. ANOVA test was performed to evaluate if FT3, FT4 and TSH IQC values could be influenced by reagent lot change.
Results FT3, FT4 and TSH mean concentrations (levels 1 and 2) for DicoCARE IQC material at reagent lot change showed a lower scattering rate than BioRad's IQC material. ANOVA test showed no statistical difference ($p < 0.05$) for all analytes and levels tested with DicoCARE IQC material when reagent lot changed, while, except for TSH level 2 ($p < 0.05$), there was a statistical difference for all analytes tested on BioRad IQC material. These data point out the importance of matrix in IQC materials for the evaluation of assay performances. Our purpose is to confirm or not this evidence including in our study patient samples too.
References Mugan K, Carlson IH, Westgard JO. Planning QC procedures for immunoassay. J Clin Immunoassay 1994; 17:216-222

179

VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DEI TEST VARELISA CELIKEY E RECOMBI tTG IgG PER IL DOSGGIO DEGLI ANTICORPI IgG E IgA ANTITRANSGLUTAMINASI UMANA NELLA DIAGNOSI DELLA CELIACHIA.

Puccetti C., Bozzi M., Panicucci E., Metelli M.R.,Berni R., Pietrini P.

Laboratorio Analisi Cliniche Specializzate, Università di Pisa, Italia.

La transglutaminasi tissutale rappresenta il principale autoantigene coinvolto nella patogenesi della celiachia, contro il quale sono rivolti gli anticorpi anti-endomisio (EMA). Elevate concentrazioni di anticorpiIgA antitransglutaminasi ed elevati titoli di anticorpi anti-endomisio IgA, sono caratteristici della malattia celiaca, in tutti i casi dove non è presente un deficit di IgA. Nei pazienti che presentano un deficit totale o parziale di IgA (10% dei casi) diviene necessario determinare la concentrazione degli anticorpi IgG antitransglutaminasi.
Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le prestazioni analitiche dei due dosaggi Varelisa Celikey e ReCombi tTG IgG per la determinazione degli anticorpi antitransglutaminasi IgA ed IgG.
Materiali e metodi
Lo studio ha valutato precisione e linearità. Per la valutazione della precisione abbiamo usato il Coefficiente di variazione % (CV%=DS/X*100, dove X rappresenta la media). Abbiamo valutato gli anticorpi antitransglutaminasi umana IgA e IgG nel siero di 10 pazienti pediatrici con sospetto clinico di celiachia. Le determinazioni sono state effettuate utilizzando Varelisa Celikey e ReCombi tTG IgG. Per la riproducibilità intraserie abbiamo eseguito i dosaggi in triplo nella stessa seduta analitica, mentre per la riproducibilità interserie abbiamo ripetuto 3 campioni per tre volte in giorni e sedute analitiche distinte. La linearità è stata valutata diluendo due campioni a concentrazione nota , ciascuno per il rispettivo dosaggio, con il tampone di diluizione.
Risultati
Il test Varelisa Celikey ha presentato un CV% di 5.07 intraserie e di 5.80 interserie. Il test ReCombi tTG IgG ha presentato un CV% di 5.08 intraserie e di 4.0 interserie. La linearità valutata nell'intervallo tra 0.30 e 30.0 U/ml con Varelisa Celikey e tra 0.30 e 13.0 U/ml per ReCombi tTG IgG, ha fornito le seguenti correlazioni: r = 0.9989 (Varelisa Celikey) ed r = 0.9999 (ReCombi tTG IgG).
Conclusioni
I risultati ottenuti dimostrano che entrambi i metodi presentano un livello di variabilità buono ed un'ottima linearità.

180

High-sensitivity method to determine IL-6 serum levels as a prognostic indicator in patients affected by angina

Lubrano V.; Cocci F.; Battaglia D.; Papa A.; Marraccini P.; Zucchelli GC.

Institute of Clinical Physiology, CNR, Pisa

The relationship between clinical manifestation of ischemic heart disease and the presence of inflammatory response is well documented. IL-6 may represent an early marker of inflammatory activation and may be useful for integrating the puzzle of risk stratification. Aim of this study was to verify the performance characteristics of an ultrasensitive immunoassay (solid phase sandwich enzyme linked-immuno-sorbent assay, Biosource International) for IL-6 measurement in a population of patients with ischemic heart disease. Moreover the concentration of CRP was analysed. We measured IL-6 and CRP levels in serum of 39 patients with ischemic heart disease (31 males and 8 females, mean age 67.3±9.8 years) and 13 controls (9 males and 4 females, mean age 68.5 years). **Out of 39 patients studied, 13** were affected by unstable angina, 13 by stable angina and 13 by unstable post-IMA angina. The imprecision profile was performed measuring 9 different serum pools in ten runs. CVs values ranged from 26.3 % at 0.57 pg/ml to 1.7% at 6.3 pg/ml; functional sensitivity (<10CV%) resulted 0.64 pg/ml. Another ultrasensitive immunoassay (sandwich enzyme immunoassay technique, R&D System) showed worse performance characteristics: functional sensitivity (<10CV%) resulted 1.5 pg/ml. In addition, by using our "routine" technique, (chemiluminescent immunoassay, Immulite, DPC) we **were** able to detect IL-6 serum levels only in 5 out of 43 patients studied. In the whole population IL-6, measured by using the Biosource method, ranged from 0.06 pg/ml to 15 pg/ml (mean 2.4±2.8 pg/ml). In control population IL-6 ranged from 0.06 pg/ml to 2.4 pg/ml. The mean value of IL-6 concentration progressively increased from controls to patients with stable, unstable and unstable post-IMA angina (1.0±0.6, 1.6±1.4, 2.1±1.1, 4.9±4.6 pg/ml respectively). CRP serum levels in the whole population measured by Immulite DPC ranged from 0.02 to 5.64 mg/dl (mean 0.8±1.1 mg/dl) and in control population ranged from 0.02 to 0.92 mg/dl. The mean values of CRP were for controls and patients with stable and unstable 0.4±0.38, 0.31±0.23, 0.99±0.98 and 1.7±1.6 mg/dl respectively. The statistical analysis for IL-6 showed a significant difference between controls and patients with unstable and unstable post-IMA angina ($p<0.05$; $p<0.01$ respectively). Significant increment of CRP levels in patients with unstable post-IMA angina respect to controls was observed ($p<0.05$). Moreover, in the all population an high significant linear regression between IL-6 and CRP serum levels was evaluated ($p<0.001$). In conclusion Biosource method for IL-6 measurement is characterized by an higher functional sensitivity allowing a better risk stratification of these patients. CRP showed a weaker association with cardiovascular disease than the cytokines.

181

DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO CEDIA DELLA CICLOSPORINA SIERICA

Cangiano G.[1], D'Amora M.[2], Sessa A.[3],Forte F.[1], Di Maina E.[1], Russo M.[1], Latte A.[2], Risitano A.[1]

ASL NA 1: [1]Laboratorio Patologia Clinica P.O. Pellegrini; [2]Laboratorio Patologia Clinica P.O. S.M. del P. degli Incurabili; [3]Day Hospital Trapiantati P.O. Pellegrini;

La ciclosporina è un undecapeptide ciclico somministrato per via orale altamente efficace per la riduzione dell'incidenza di rigetto a seguito di un trapianto d'organo.
La determinazione ematica della ciclosporina, la valutazione di altri dati di laboratorio e le considerazioni cliniche consentono un'adeguata terapia immunosoppressiva e la riduzione degli effetti collaterali in pazienti sottoposti a trapianti di organi.
Col presente lavoro si propone una modifica all'immunodosaggio enzimatico omogeneo CEDIA, effettuato sull'analizzatore di chimica clinica AU 400 della ditta Olympus, al fine di dosare contemporaneamente sia i livelli bassi che alti di ciclosporina evitando così il passaggio da una metodica all'altra effettuabile solamente a strumentazione ferma.
Il dosaggio della ciclosporina al tempo zero e dopo due ore viene effettuato con un'unica calibrazione a 6 punti, partendo da un punto zero (acqua distillata), utilizzando i tre calibratori necessari per estrapolare concentrazioni basse ed alte (25, 400 e 2000 ng/mL circa) e sfruttando altre due diluizioni intermedie ottenute tra calibratori in dotazione.
A 195 □L di reagente R1(anticorpi monoclonali murini anti-ciclosporina, tampone MOPS ed accettore enzimatico) vengono miscelati 6 □L di campione (100 mL di sangue anticoagulato con EDTA e 400 mL di reagente lisante.
Dopo opportuna incubazione (circa 10 cicli macchina) l'analizzatore biochimico inserirà il reagente R2 (donatore enzimatico coniugato con ciclosporina e tampone MES). La lettura in cinetica verrà effettuato tra i cicli 24 e 27 alla lunghezza d'onda primaria di 570 nm ed a quella secondaria di 660 nm.
Nell'intervallo analitico compreso tra 120 e 2000 ng/mL di ciclosporina viene evidenziato un profilo di imprecisione mostrante un CV% < 6% . Al di sotto di tale range di concentrazione il coefficiente di variazione può raggiungere anche valori prossimi al 20% e precisamente a 26 ng/mL. Le prove di recupero mostrano coefficienti di variazione compresi tra l' 84,3 ed il 99,4% (recupero medio del 95,1%). Le prove di precisione nella serie e tra le serie, mostrano CV% inferiori al 5% .

182

THE SUSCEPTIBILITY TO APO C-III LOWERING EFFECTS OF n-3 PUFA IS GENETICALLY MODULATED BY T-455C APOC3 GENE POLYMORPHISM

Bassi A, Olivieri O*, Martinelli N*, Sandri M*, Guarini P*, Trabetti E[§], Pizzolo F*, Girelli D*, Friso S*, Pignatti PF[§], Corrocher R*

Institute of Clinical Chemistry, *Unit of Internal Medicine, Department of Clinical and Experimental Medicine,[§] Section of Biology and Genetics, Department of Mother and Child and Biology – Genetics, University of Verona, Italy.

Apolipoprotein C-III is a marker of cardiovascular risk associated with TG-rich lipoproteins. The T–455C polymorphism in the insulin responsive element of APOC3 gene influences TG and apo C-III levels. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) contained in fish have well known apo C-III-lowering properties.
We investigated the possibility of an interactive effect between the APOC3 gene variant and red blood cell (RBC) n-3 PUFA (considered as suitable markers of fatty acids dietary intake) on apo C-III levels of a population of 873 patients with or without coronary artery disease (CAD). Apolipoprotein C-III was measured by a fully automated turbidimetric immunoassay and red blood cell (RBC) n-3 PUFA by gaschromatography. All subjects were genotyped for APOC3 T-455C polymorphism. Statistical analysis were performed by using the STATA 8.0 statistical package. Gene-dietary interaction effects were analyzed by logistic models. The statistical significance of the interaction term was tested by the likelihood ratio (LR) test.
In total population, apo C-III levels were negatively correlated with total RBC PUFA, but statistical significance disappeared in –455CC homozygous individuals. In total population or in –455TT or –455CT patients subgroups, the relative proportion of subjects presenting apo C-III concentration $\geq$11.9 mg/dL (=75th percentile value of CAD-free population) (h-apo C-III) decreased progressively as RBC PUFA content increased. The opposite situation was observed in –455CC homozygous subgroup, in whom increasing RBC PUFA content was associated with the higher proportion of h-apo C-III subjects. A similar interactive effect was also observed for n-3 PUFA and docosaexanoic acid, and it was confirmed after adjustment for possible confounding variables (age, sex, BMI, smoking). These findings suggest that the susceptibility to apo C-III-lowering effects of n-3 PUFA is genetically modulated by T–455C APOC3 gene polymorphism.

183

CHEMILUMINESCENCE ASSAY OF HUMAN SERUM OXIDATION

Albertini R.[1], Leoni V.[2], Borroni P.[2], Passi A.[2], Alpini C.[1], Melzi d'Eril G.[2] , Moratti R.[1], De Luca G.[2]

[1]Laboratory of Clinical Chemistry, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; [2]Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, Varese, Italy.

Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of various chronic diseases, in particular atherosclerosis, cancer and neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease. In particular, the oxidative hypothesis of atherosclerosis is based on the increased atherogenic properties of oxidized lipoproteins which have a potentially atherogenic biological effects, such as uncontrolled uptake by scavenger receptors of arterial macrophage, cytotoxicity. The measurement of oxidative stress, particularly in biological fluids such as human serum, is problematic. In this study a procedure is described which allows the measurement of the susceptibility of serum lipoprotein towards oxidation; the basis of this method is the monitoring of low-level chemiluminescence associated with lipid peroxidation, in the absence of enhancers of chemiluminescence. As compared with procedures which included a high dilution of the serum, in the present method serum is moderately diluted with the incubation solution containing the oxidation trigger (the final dilution is 4-fold); for this reason, in our procedure serum water-soluble antioxidants are likely to contribute to lipoprotein resistance against oxidation, similarly to the process of lipoprotein oxidation in vivo. In line with previous studies mainly conducted on isolated lipoprotein, serum oxidation exhibited a lag phase, a propagation phase and a termination phase. The onset of propagation phase followed the consumption of the main water- and lipid-soluble antioxidant, in particular ascorbic acid, uric acid, □- and □-tocopherol. Spectral analysis indicated that the maximum emission of peroxidation associated low-level chemiluminescence was between 420 and 480 nm, corresponding to triplet carbonyl compounds which are formed after recombination of two lipid peroxyl radical to a non-radical compound. As a conclusion, the present method is a simple and convenient tool for continuous monitoring of serum oxidation, which may be applied to basic biochemical and clinical studies.

184

ANTICORPI ANTI-LDLOX, ANTI-FOSFOLIPIDI E LDLOX IN PAZIENTI AFFETTI DA CORONAROPATIA

Bernardi D.; Celadin M.; Pittoni M.; Zaninotto M.; Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova

Scopo Verificare se le concentrazioni di LDLox e anticorpi anti-LDLox forniscono informazioni aggiuntive rispetto ai tradizionali indicatori biochimici, colesterolo LDL e HDL trigliceridi, nello studio di pazienti affetti da coronaropatia.
Materiali e metodi LDLox (MERCODIA Oxidized LDL ELISA, Test Medical, Bologna), **anticorpi anti-LDLox** (Anti oxLDL IgG/IgM, IMTEC, ALFA WASSERMANN, Milano) e **anticorpi IgG/IgM anti-Cardiolipina, -□2Glicoproteina, -Protrombina, -Annexina V** (Orgentec, S.p.A. Italiana Laboratory Bouty, Milano) sono state determinate in un gruppo di 36 soggetti (26 maschi, 10 femmine) cardiopatici (14 con angina instabile, 22 con angina stabile), di cui 18 trattati con statine. Nello stesso gruppo di pazienti sono state determinate le concentrazioni di colesterolo, trigliceridi, LDL e HDL (MODULAR DP, Roche Diagnostics, Milano).
Risultati. Le concentrazioni (media ± Errore Standard) di **LDLox** nei maschi (57.93±3.45) risultano statisticamente (p=0.01) superiori rispetto a quelle delle femmine (42.16±4.65) sia nei soggetti trattati (maschi (62.3±5.17; femmine 42.85±8.12; p=0.05) che in quelli non trattati (maschi 53.87±3.97; femmine 41.47±5.59; p=0.05). Le concentrazioni di LDLox correlano significativamente con LDL (r=0.62; p=0.0001) trigliceridi (r=0.66; p=0.0001) e colesterolo (r=0.68; p=0.0001). Le concentrazioni di **anti-LDLox** risultano significativamente (p=0.05; femmine p=0.05; maschi p non significativa) maggiori nei soggetti che assumono statine (33.89±4.37; femmine 39.6±9.36; maschi 31.51±4.93) rispetto a quelli non sottoposti a trattamento (24.42±3.72; femmine 20.58±4.07; maschi 25.89±4.94). Anche le concentrazioni di **anticorpi antifosfolipidi** sono significativamente (p=0.003; femmine p=0.001; maschi p non significativa) superiori nei soggetti che assumono statine (4.42±0.45; femmine 5.36±0.72; maschi 4.05±0.56) rispetto a quelli che non le assumono (3.05±0.22; femmine 2.81±0.29; maschi 3.14±0.28). Non si riscontra nessuna differenza tra pazienti trattati e non trattati se si condiderano LDL, HDL colesterolo trigliceridi.
Conclusioni. Gli anticorpi anti-LDLox e il pannello di anticorpi anti-fosfolipidi considerato presentano concentrazioni statisticamente differenti nei pazienti coronaropatici in relazione al trattamento con statina, diversamente da LDLox, LDL, HDL, TG, colesterolo. Pertanto potrebbero essere considerati nuovi marcatori biochimici utili per approfondire le conoscenze sul ruolo immunomodulante delle statine.

185

COMBINED DIETARY SUPPLEMENTATION IMPROVES OXIDATIVE AND INFLAMMATORY STATUS IN DYSLIPIDEMIA

Caruso R.[1], Accinni R.[1], Rosina M.[2], Campolo J.[1], Della Noce C.[1], Tonini A.[1], Lonati S.[2], Novembrino C.[3], Bernacchi F.[4], Gorini M.[5], Bamonti F.[2]

[1]Institute of Clinical Physiology, CNR, Milan; [2]Medical Science Dept, [3]Sugical Science Dept, Università degli Studi, Ospedale Maggiore – IRCCS, Milan; [4]Reservice SRL-Unipro Milan; [5]AaFAR S.C Centre FBF, S. Colombano, Milan

Background. Oxidative stress is known to be the main cause of altered cellular homeostasis, inflammation and endothelial damage through closely correlated mechanisms. Polyunsaturated fatty acids n-3 (PUFA n-3) regulate lipid metabolism affecting different metabolic pathways (1). **Aim**. To verify if the addiction of vitamin E, gamma -oryzanol and niacin to PUFA n-3 can affect thiol redox status, oxidative and inflammatory status in dyslipidemia. **Study design**. Sixty-four dyslipidemic subjects (aged 29-65 yrs) were enrolled, randomized in three groups (A: 20, placebo; B: 20, PUFA n-3 + vitamin E; C: 24, the same as B + gamma-oryzanol and niacin). The following parameters were determined at baseline T0, after three (T1) and six (T2) months: lipid pattern (total cholesterol, HDL cholesterol, LDL-cholesterol and tryglicerides); reactive oxygen species (ROS); total antioxidant capacity (TAC); vitamin E; thiol redox status; cytokines (IL-1, TNF); neopterin, and thromboxane B_2 (TXB_2).
Results. At T0 oxidative stress markers appeared to be altered; at T1 and T2, both B and C showed a significant improvement in the lipid pattern and a significant reduction in TXB_2, ROS, IL-1 and TNF, but not in neopterin levels. Moreover a significant increase in vitamin E is observed in group C ($p<0.05$ vs B). The positive effect of dietetic treatment on ROS may activate glutathione turnover and catabolism, as shown by significant decrease of reduced blood glutathione and increase of total plasma cysteinylglycine at T2 compared to T0 ($p<0.05$). Cysteine is recently indicated as cardiovascular risk factor in dyslipidemic subjects; total plasma cysteine baseline levels in some of our dyslipidemic subjects were both lower (25%) and higher (26%) compared to reference interquartile interval. After treatment cysteine concentrations were restored to normal range in both groups (B and C).
Conclusion. Vitamins and gamma-oryzanol combined with PUFA n-3 improve lipid pattern, oxidative status (thereby saving vit. E), thiol redox status and cytokines. No changes are found in neopterin levels, probably due to down regulation of PGE_2, a prostanoid involved in neopterin metabolism through gamma interferon action.

1) Calder PC. N-3 polyunsatured fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. Lipids 38(4): 343-52, 2003

186

AMILOIDOSI AL: LA RIDUZIONE DELLE CATENE LEGGERE LIBERE CIRCOLANTI SI ASSOCIA A RIDUZIONE DEL PEPTIDE NATRIURETICO B.

Lavatelli F.[1]; Palladini G.[1]; Bosoni T.[2]; Melzi D'Eril G.[3]; Moratti R.[2]; Merlini G[1].

[1]Lab. Biotecnologie – Dip. di Biochimica, [2]Servizio Analisi Chimico-Cliniche, IRCCS San Matteo e Università di Pavia, Pavia, [3]Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università dell'Insubria, Varese.

Introduzione. Il meccanismo alla base del danno d'organo nell'amiloidosi AL non è definito, nonostante alcune osservazioni indichino che il precursore amiloidogenico circolante giochi un ruolo importante. Il frammento N-terminale del pro-peptide natriuretico B (NT-proBNP) è un marcatore sensibile di disfunzione cardiaca nell'AL (Circulation 2003; 107:2440-5). La disponibilità di un test quantitativo per le catene leggere libere (FLC) circolanti rende possibile misurare la concentrazione del precursore.
Metodi. In 21 pazienti (12 maschi, età mediana 59 anni, range 28-75) con amiloidosi AL cardiaca sintomatica (valutata con criteri clinici ed ecocardiografici) sono state misurate la concentrazione sierica di NT-proBNP e di FLC al momento dell'arruolamento e della valutazione della risposta alla chemioterapia. In tutti i pazienti è stata individuata una componente monoclonale (CM) con elettroforesi ad alta risoluzione su gel d'agarosio ed immunofissazione. La concentrazione delle FLC è stata misurata con un latex-enhanced immunoassay (The Binding Site, Birmingham, UK) su nefelometro Behring BN II (Dade Behring, Deerfield, IL, USA). L'intervallo di riferimento per le FLC kappa e lambda è, rispettivamente, 3.3-19.4 mg/L e 5.7-26.3 mg/L, con rapporto kappa/lambda medio 0.59 (95% IC 0.3-1.2). La concentrazione di NT-proBNP è stata determinata in elettrochemiluminescenza (ECLIA, Roche) su Elecsys System 2010. I limiti superiori dell'intervallo di riferimento in uomini e donne sono, rispettivamente, 26.4 pmol/L e 39.8 pmol/L (per età >50 anni).
Risultati. In 11 pazienti (52%) si è osservata riduzione >50% di FLC ed in 9 (43%) la concentrazione di FLC e il rapporto kappa/lambda si sono normalizzati, con scomparsa della CM alla immunofissazione in 7 casi (33%). Tutti i pazienti in cui la concentrazione di FLC si è ridotta di almeno il 50% hanno ottenuto riduzione di NT-proBNP (mediana: 70%, range: 30-95%), che si è normalizzato in 3/11. In 6/11 lo scompenso cardiaco si è risolto. La variazione percentuale della concentrazione di NT-proBNP è correlata alla variazione percentuale della concentrazione di FLC (test di Spearman, p=.04). La diminuzione di FLC indotta dal trattamento è stata accompagnata da una riduzione dell'NT-proBNP sierico in tutti i pazienti, con rapido miglioramento della funzione cardiaca in un terzo di essi.
Conclusione. Questi risultati indicano che le catene leggere circolanti esercitano un effetto tossico diretto sui cardiomiociti ed evidenziano l'importanza di una rapida riduzione del precursore amiloidogenico circolante con la terapia.

187

RELAZIONE TRA VALORI DI NT-proBNP ED ESTENSIONE DELLA MALATTIA CORONARICA NELLA SINDROME CORONARICA ACUTA.

Tarantini L.*; Del Giudice G.; Roncada T.; Bellenzier M.; Olivotto F.; Rocchi A.; Palatini O.*; Tessier R.*; Catania G.*

UOA Laboratorio Analisi Chim-clin e Microbiologia Pieve di Cadore (BL), * UOA Cardiologia Belluno.

PREMESSA: vi è la crescente evidenza del valore prognostico dei peptidi natriuretici cardiaci nelle Sindrome Coronarica Acuta (SCA). E' inoltre noto che uno dei maggiori fattori prognostici nella malattia coronarica è rappresentato dal numero di vasi stenotici.
FINALITA': scopo del presente lavoro è stato di valutare se esiste una relazione tra il valore sierico del frammento N-Terminale del pro Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) e numero di vasi stenotici riscontrati alla coronarografia in una serie consecutiva di pazienti ricoverati per SCA presso l' unità coronarica di Belluno dall'1/1/2003 all'1/11/2003.
MATERIALI E METODI: 102 pazienti (69 M, 33 F) ricoverati per SCA e sottotopsti a cateterismo cardiaco sono stati sottoposti a prelievo ematico per la determinazione del NT-proBNP in 4ª giornata di degenza o ad avvenuta stabilizzazione clinica. Il dosaggio del peptide è stato eseguito con tecnologia in elettrochemiluminescenza (Elecsys pro BNP su Elecsys 2010, Roche Diagnostics). Alla coronarografia sono stati considerati stenotici i vasi con un restringimento del lume ≥60%.
RISULTATI: sono stati riscontrati i seguenti valori di NT-proBNP: media 2303 ± 5146 ng/l, mediana 575 (range 32 – 31829 ng/l), 25°-75° percentile 222 - 1577 ng/l. All'analisi multivariata (regressione logistica multipla stepwise forward) l'interessamento multivasale era predetto dal seguente modello:

Variabile	OR	95% IC	p
Sesso (maschio)	3.0	3.7 – 113.01	0.0005
Dislipidemia	1.5	1.1 – 19.4	0.02
IVSN	-1.6	0.04 – 0.8	0.02
Familiarità	-3.0	0.003 – 0.8	0.03
ProBNP< 25°p	-1.5	0.04 – 0.9	0.03

CONCLUSIONI: dal nostro lavoro preliminare emerge che un basso valore di NT-proBNP eseguito nella fase iniziale della SCA è un fattore predittivo negativo l'interessamento multivasale.

188

NUOVO METODO PER IL DOSAGGIO DELLA MIOGLOBINA APPLICATO ALLO STRUMENTO ACCESS

Forni M., Mion M., Altinier S., Zaninotto M., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

In questo studio vengono riportati i risultati della valutazione del nuovo metodo Access (Beckman Coulter) per il dosaggio della mioglobina, con particolare attenzione alla valutazione dei limiti di cui risentiva maggiormente la versione precedente.
Le determinazioni sono state eseguite su campioni di plasma litio eparina e le concentrazioni espresse in μg/L.
Sensibilità analitica: 0.446 (media=0.320, DS=0.042) ottenuta da 10 determinazioni dello standard zero.
Linearità: ricavata dosando 4 diluizioni di un pool con concentrazione 30% superiore al massimo valore della curva di calibrazione (4000): osservati = 0.988 attesi + 1.1.
Imprecisione: eseguita in accordo al documento NCCLS EP5, su 3 pool con concentrazioni di mioglobina normale (50), borderline (100) e patologica (300) in doppio in 20 giorni diversi ha fornito CV% compresi tra 3.0 e 5.4, quindi entro l'obiettivo previsto sulla base della variabilità biologica.
Interferenze da anticoagulanti: 31 campioni sono stati raccolti con diversi anticoagulanti (K3 EDTA, sodio citrato, litio eparina con gel separatore). Le concentrazioni ottenute nei campioni con sodio citrato sono risultate più basse (differenza media 3%), anche se la differenza non è risultata statisticamente significativa.
Interferenze da sostanze endogene: due pool con concentrazioni bassa (35) e alta (160) di mioglobina sono stati diluiti con campioni contenenti concentrazioni elevate di albumina, emoglobina e bilirubina (100 g/L, 10 g/L e 332 μmol/L), e confrontati con le corrispondenti diluizioni ottenute utilizzando il diluente raccomandato dalla ditta, hanno evidenziato una differenza media <10%. In due pool sono state dosate le concentrazioni di mioglobina prima e dopo l'aggiunta di campioni (n=10) contenenti elevate concentrazioni di fattore reumatoide (range concentrazioni: 126-3200 kU/L) ottenendo una differenza <3%, non correlata alle concentrazioni di fattore reumatoide. Questi dati sono stati confermati analizzando gli stessi campioni con un altro metodo (RxL, Dade Behring), che è risaputo non risentire di questo tipo di interferenza.
Questi risultati sottolineano l'importanza di raggiungere un buon livello di standardizzazione per il dosaggio della mioglobina relativamente al tipo di campione, alla massima imprecisione accettabile e alla mancanza di interfererenze. In questo senso il nuovo metodo Access è in grado di garantire le specifiche di qualità raccomandate per il dosaggio dei marcatori cardiaci.

189

LOW VITAMIN B_6, MARKERS OF INFLAMMATION AND RISK OF CORONARY ARTERY DISEASE.

Friso S.,*,§ Martinelli N.,* Girelli D.,* Lotto V.,* Olivieri O.,* Pizzolo F.,* Bozzini C.,* Faccini G.,# Bertozzo L.,# Bonetto M.G.,# Gerani C., # Poffe R.,# Tinazzi E.,* Beltrame F.,‡ Corrocher R.*

*Department of Clinical and Experimental Medicine, #Institute of Clinical Chemistry, and ‡Institute of Cardiology, Policlinico, University of Verona, Italy, and § JM USDA HNRC at Tufts University, Boston, MA, USA.

Background: It has been reported that low levels of pyridoxal-5'-phosphate (PLP), the major coenzyme of vitamin B_6, are associated with high serum C-reactive protein (CRP). Both low PLP, and elevated CRP levels have been related to higher risk for coronary artery disease (CAD). The present study was undertaken to assess a possible interaction of PLP with inflammatory markers in affecting CAD risk.
Materials and Methods: We studied 742 subjects, 475 of whom with angiographically documented severe multivessel CAD, and 267 free of coronary atherosclerosis (CAD-free). We evaluated the classical lifestyle-related risk factors and biomarkers of atherosclerosis, in which PLP and the acute-phase reactants high sensitivity CRP (hs-CRP) and fibrinogen, were also included.
Results: A significant inverse relationship was identified between PLP and levels of hs-CRP as well as fibrinogen ($P<0.001$). Plasma PLP was lower in CAD than in CAD-free subjects ($P<0.001$) and the prevalence of subjects with lower PLP levels (i.e.<50^{th} percentile, 36.3 nmol/L) was significantly more represented among CAD than CAD-free ($P<0.001$). The unadjusted OR for low PLP levels vs. CAD was 1.71 (95% CI, 1.26-2.32, $P<0.001$), value confirmed even after adjustments for the major risk factors for CAD, including tHcy, hs-CRP and fibrinogen (OR=1.89, 95% CI, 1.18-3.03, P=0.008). Low PLP levels, furthermore, added a significantly higher risk for CAD to the presence of elevated hs-CRP and increased LDL/HDL ratio alone.
Conclusions: PLP is inversely related to hs-CRP and fibrinogen levels, however, low levels of PLP represented a risk factor for CAD, even independently of markers of inflammation. Moreover, low PLP confers a significant additional risk to the coexistence of other well-established risk factors for atherosclerosis.

190

UTILIZZO DEI MARCATORI CARDIACI NEL PAZIENTE GERIATRICO: NOSTRA ESPERIENZA.

Castiglione C., Mascitelli M., Palmucci Z., Ciantra G., Tresca E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P.O. "S. Massimo" Penne (PE),

Introduzione
L'avvento di marcatori cardiaci più cardiospecifici, ha notevolmente modificato l'approccio e la diagnosi dell'IMA ed ha consentito di valutare un'eventuale necrosi miocardica anche in quei pazienti che non mostrano alterazioni all'ECG. In tali situazioni la diagnosi si basa sull'andamento temporale della concentrazione dei marcatori biochimici di danno miocardio ed in particolare della Troponina. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'uso in urgenza dei marcatori biochimici di danno miocardico nella gestione del paziente anziano, nel corso dell'anno 2003. I campioni inviati erano riferiti a pazienti con diagnosi prevalente di dolore in regione epigastrica o toracica ed in rari casi con dispnea. Abbiamo voluto valutare la percentuale di pazienti che mostravano alterazioni della Troponina T tali da essere indicative di danno miocardico, per verificare la significatività delle richieste pervenuteci dal reparto di Geriatria
Materiali e metodi
Nel nostro Laboratorio Analisi eseguiamo le determinazioni della Troponina T, Mioglobina, CK-MB con Elecsys 2010. Tale metodica è sottoposta a CQI giornaliera a due livelli. Viene utilizzato plasma EDTA dopo centrifugazione. Abbiamo adottato due livelli decisionali per la Troponina T uno per IMA 0.2 ng/mL e uno per "danno miocardico minimo" 0.03 ng/mL.

Risultati

TOTALE DETERMINAZIONI Troponina TnT **428**	
CAMPIONI con TnT>0.03ng/mL con evoluzione IMA **13**	CAMPIONI con TnT>0.03ng/mL senza evoluzione IMA **25**
NEGATIVI **390**	

Conclusioni
La valutazione dei valori della Troponina T nei campioni inviati nel periodo di tempo studiato, indica una percentuale del 3% di pazienti che mostrano un innalzamento della stessa sopra il limite decisionale per IMA. Questo dato, ci induce a pensare che nella realtà studiata, i nuovi marcatori di danno miocardico, vengono richiesti più per effettuare una diagnosi di esclusione di IMA, che per conferma di un dubbio diagnostico.

191

CONFRONTO TRA DUE TECNOLOGIE PER LA DETERMINAZIONE PLASMATICA DEL BNP

S. Bertulu, M.M. Manca, A. Azzena, R. Borto, M.C. Marogna, G.B. Cherchi

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale SS. Annunziata, Sassari

Il peptide natriuretico di tipo B (BNP), ormone secreto dal miocardio ventricolare in risposta allo stimolo dilatativo, è un indicatore di insufficienza ventricolare sinistra, utilizzato sia nella diagnosi differenziale in urgenza che nella stratificazione del rischio cardiovascolare. Il metodo "classico" per la determinazione del BNP è l'IRMA, in confronto con il quale abbiamo valutato un nuovo metodo automatizzato MEIA (Abbott AxSYM BNP).
Materiali e metodi: Il metodo IRMA Shionogi è un dosaggio a doppio monoclonale con una soglia di 18,4 pg/mL, calcolata in base alla distribuzione dei valori in una popolazione normale, e "range" dinamico tra 2 e 2.000 pg/mL. Il test AxSYM, anch'esso a doppio monoclonale e quantitativo, ha soglia a 100 pg/mL (calcolata mediante curva ROC) e range tra 15 e 20.000 pg/mL. I due metodi sono stati confrontati analizzando in parallelo con entrambi i reciproci controlli interni e 66 campioni della "routine".
Risultati: la concordanza qualitativa tra i due metodi è risultata del 97% (64/66), con due campioni sopra la soglia con IRMA e negativi con AxSYM. Il confronto tra i valori ottenuti sia sui controlli che sui campioni ha messo in evidenza una ottima correlazione (r= 0,98, l.c. 95%: 0,97-0,99); il confronto tra metodi secondo Passing e Bablok ha fornito l'equazione AxSYM= 2,07x IRMA –1,89, mentre l'analisi di Bland-Altman ha evidenziato un "bias" proporzionale dei valori AxSYM rispetto ad IRMA per l'ambito dei risultati ottenuti (da 15 a oltre 4.000 pg/mL).
Conclusioni: Tra i due metodi vi è una elevata concordanza e un'ottima correlazione. I valori AxSYM sono costantemen te più elevati dei valori Shionogi, probabilmente a causa del differente disegno dei due test, che porta anche ad una diversa sensibilità analitica. Il sistema AxSYM presenta indubbi vantaggi operativi (rapidità, automazione, "shelf-life superiore) e appare comunque possibile effettuare una conversione dei valori ottenuti con i due metodi.

192

ASSESSMENT OF MYOCARDIAL INFARCTION SIZE AND LEFT VENTRICULAR FUNCTION USING ACCESS AccuTnI™ TROPONIN I ASSAY

Pagani F. (1), Bonetti G. (1), Stefini F. (1), Giubbini R. (2), Cuccia C. (3), Panteghini M. (1)

(1) Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, (2) Servizio di Medicina Nucleare and (3) Cattedra-Divisione di Cardiologia, A.O. "Spedali Civili" – Università, Brescia

Purpose: Although cardiac troponins have been proposed as new biochemical standard for diagnosis of acute myocardial infarction (AMI), one of the concerns about fully replacing CK-MB with their measurement is the lack of evidence on their ability to estimate the infarct size (IS) in clinical practice. Only few studies have evaluated cardiac troponin I (cTnI) as marker for IS assessment, using however first-generation assays, serial measurements to calculate cTnI peak concentrations and very selected populations. Here we used a last-generation assay (Access AccuTnI™, Beckman Coulter) to investigate the ability of a single-point cTnI measurement to estimate IS and assess left ventricular (LV) function in AMI patients admitted to our general hospital and chosen without selection bias.
Methods: We studied 63 consecutive AMI patients, presenting 4.5 h (range, 0.5-19) after the symptom onset, in whom LV function was evaluated by gated single-photon emission computed tomography (SPECT) imaging and IS was estimated by CK-MB peak concentrations (serum samples taken every 6 h throughout the first 48 h after admission) and SPECT myocardial perfusion using technetium 99m-sestamibi. Measurements of serum cTnI were performed on samples collected 12 and 48 h after admission, approximately corresponding to the time peak and to the plateau phase of cTnI release in blood after AMI. LV function and IS were evaluated by SPECT before hospital discharge. A further SPECT estimation of LV function was performed 3 months later.
Results: The perfusion defect sizes at SPECT, expressed as % of left ventricle, ranged from 0% to 63% (median, 21%) and LVEF in the acute phase ranged from 17% to 58% (median, 41%). Significant correlations ($p<0.001$) were found between cTnI at 12 h (median 79.9 μg/L, range 1.8-958.5) and at 48 h (median 14.7 μg/L, range 0.24-56.6) and both the peak CK-MB ($r=0.61$ and $r=0.82$, respectively) and the perfusion defect size at SPECT ($r=0.55$ and $r=0.61$, respectively). cTnI at 12 and 48 h was inversely related ($p<0.001$) to LVEF assessed both early ($r=-0.45$ and $r=-57$, respectively) and 3 months after AMI ($r=-0.51$ and $r=-0.69$, respectively). cTnI >14.8 μg/L 48 h after admission predicted a LVEF <40% at 3 months with a sensitivity of 100%, specificity of 65.1%, and a negative predictive value of 100%.
Conclusions: A single cTnI measurement 48 h after patient admission is useful as a noninvasive estimate of IS and for ruling out impaired LV function in routine clinical setting.

193

IL DOSAGGIO DELL'NT-proBNP IN PAZIENTI AMBULATORIALI CON SCOMPENSO CARDIACO.

Di Serio F., Varraso L.,Valentino P., Catacchio F., Rosato V., Mazzarella A., Pansini N.

Patologia Clinica I, Policlinico Bari, Bari.

Scopo. In pazienti ambulatoriali con scompenso cardiaco, l'NT-proBNP misurato prima della terapia e nel follow-up (un mese) è stato correlato alla valutazione clinica dei pazienti; i valori di riferimento sono stati correlati all'età ed al sesso. **Metodo.** L'NT-proBNP è stato dosato con il metodo "ECLIA" su Elecsys 2010 (Roche); lo studio di precisione è stato condotto in accordo con le linee guida NCCL (EP5-A). L'NT-proBNP è stato misurato in sieri di 140 soggetti sani (70maschi e 70 donne) di età compresa tra 20 e 80 anni e di 26 pazienti con scompenso cardiaco: maschi 20 (77%), età 61(mediana; IC, 53-73), cardiopatia ischemica 12 (46%), LVEF 20%(mediana). **Risultati.** Studio di precisione: C1 (media 276 pg/ml), Total CV% = 5.2; C2 (media 6249 pg/ml), Total CV% = 6%; Pool (media 1376 pg/ml), Total CV%= 6.2. La tabella 1 riporta i dati relativi alla popolazione di riferimento:

Anni	Sogg.	mediana	IC	25°P	75°P
20-30	maschi	6.72	5-19.4	5	19.8
	femm.	30	18.7-39	23.5	38.2
30-40	maschi	13.2	5-26.3	5.2	21.9
	femm.	31.5	16.2-46	22.4	31.5
40-60	maschi	21	6.9-46.8	6.9	50.3
	femm.	69	37.6-91	55	87
60-80	maschi	100.8	17.7-155	41.2	149.6
	femm.	94	67-115	67	114.3

Statisticamente significativa era la differenza tra le fasce d'età in entrambi i sessi (test di Kruskall-Wallis: $p<0.0001$) nei soggetti sani e la comparazione dell'NT-proBNP con la severità delle classi NYHA (III vs IV) in pazienti con scompenso ($p=0.0032$). In tabella 2 sono riportate le caratteristiche cliniche dei pazienti e la concentrazione dell'NT-proBNP prima del trattamento terapeutico e dopo 1 mese.

	Score >2 n,%	NYHA II-III-IV n,%	NT-proBNP* mediana pg/ml
Prima valutazione	20 (77)	III = 17 (65) IV = 9 (35)	5335.5
Follow-up	5 (19)	II = 4 (15) III = 20 (77) IV = 2 (8)	2297.5 *p=0.0012 (Wilcoxon)

Due pazienti (7.6%) nei quali dopo un mese di terapia non si riscontrava un decremento del peptide, andavano incontro ad exitus (paziente 1: ratio NT-proBNP pre/post-terapia =0.06. Paziente 2: ratio NT-proBNP pre/post-terapia =0.9). **Conclusioni:** l'NT-proBNP correla con la valutazione clinica dei pazienti in terapia; il mancato decremento può costituire un indice di prognosi avversa a breve termine. **Bibliografia**
Troughton R. et al. Lancet 2000;335:1126-1130.

194

MEASUREMENT OF PLASMA C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE: A METHODOLOGICAL EVALUATION.

Del Ry S., Maltinti M., Passino C., Emdin M., Giannessi D.

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy.

C-type natriuretic peptide (CNP) is the most highly conserved of the natriuretic peptides between species. Two forms of the peptide exist: CNP-53 predominates in tissues and CNP-22 found mainly in plasma. Most of the data on the biological effects of the peptide relate to the 22-amino-acid form, whose role in cardiovascular medicine is now largely investigated. In this study the analytical performance of a commercial radioimmunoassay (RIA) for CNP was evaluated and plasma CNP was measured in 21 healthy subjects and in 87 patients affected by chronic heart failure (CHF) of either idiopathic or post-ischemic origin, (EF<50%, 12 in NYHA class I, 47 in class II, 22 in class III, and 6 in class IV, age 63±1.3 yrs). Plasma samples were collected in presence of EDTA and aprotinin to prevent the proteolytic breakdown of peptide. A preliminary solid-phase extraction on Sep-Pak C18 was carried out on all samples (extraction recovery, evaluated by addition of both synthetic and radiolabelled CNP to plasma samples, was 78±3 %). Accuracy was evaluated by dilution and recovery tests: a linearity of the response between 20 and 350 □l of extracted plasma was observed. Recovery, evaluated by adding known amounts of CNP (20-640 pg/tube) to a plasma pool, was about 80%. For RIA intra-assay variability resulted about 5%, inter-assay variability 7% and sensitivity 0.41±0.015 pg/tube. The plasma levels (mean±sem) of CNP in healthy subjects were 2.7±0.22 pg/ml and resulted significantly increased in patients with CHF, as a function of clinical severity: 6.0±0.92 pg/ml in NYHA class I ($p=0.007$ vs. controls); 6.6±0.51 pg/ml in class II ($p<0.0001$ vs. controls); 8.4±0.83 pg/ml in class III ($p<0.0001$ vs. controls; $p<0.05$ vs. and II), and 13.7±2.6 pg/ml in class IV ($p<0.0001$ vs. controls, class I, II; $p=0.0013$ vs. class III). The sensitivity, accuracy and reproducibility levels of the proposed method for CNP assay resulted suitable for reliably detect changes in CNP plasma levels in CHF patients as a function of severity.

Kalra PR, Anker SD, Struthers AD, et al. The role of C-Type natriuretic peptide in cardiovascular medicine. Eur Heart J. 2001;22: 997-1007.

195

RUOLO DEL TNF-α NELLA CARDIOTOSSICITÀ DA ANTRACICLINE: STUDI SU CARDIO-MIOBLASTI DI RATTO IN CULTURA (H9c2).

Chiosi E., Sorrentino A., Romano M., Spina A., Fusco A., Naviglio S., Pagano M., Illiano F., and Illiano G.

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli, Napoli

Obiettivo: La doxorubicina (DXR) è un antibiotico antineoplastico largamente usato nel trattamento terapeutico di tumori solidi ed ematologici il cui impiego, purtroppo, è limitato dalla alta incidenza di tossicità cardiaca. La cardiotossicità da antracicline, i cui meccanismi patogenetici sono ancora poco noti, può verificarsi in corso di trattamento (aritmie atriali e ventricolari) o anche a distanza di anni da esso (cardiomiopatie ed insufficienza cardiaca congestizia).
Il TNF-α, citochina proinfiammatoria prodotta anche dal cuore in alcune condizioni di stress, esercita sul miocardio effetti inotropi negativi (a breve termine) ed induce ipertrofia ed apoptosi (a lungo termine). Studi clinici hanno correlato i livelli sierici di TNF-α con l'insufficienza cardiaca congestizia non potendo chiarire però, il contributo del miocardio stesso nella produzione di questa citochina. A questo scopo abbiamo voluto studiare gli effetti della DXR sulla produzione del TNF-α nei cardiomioblasti parallelamente a quelli, prevedibili, citotossici.
Metodi: Cellule di cardiomioblasto di ratto (H9c2) venivano coltivate in DMEM con FBS al 10% e trattate a tempi diversi (da 18 ore a 30 min) con dosi variabili di DXR (da 0.1 a 10 μM) e/o sostanze stimolanti la produzione di TNF-α.
Venivano valutate le modifiche citomorfologiche, alcuni parametri biochimici di danno cellulare ed i livelli di TNF-α e del suo recettore libero sia con tecnica ELISA che mediante Immunoblotting.
Risultati: I dati ottenuti confermano una stretta correlazione tra durata e dose di esposizione alla DXR con i livelli di TNF-α e con i dati biochimici e morfologici di citotossicità. Gli effetti della DXR sulla produzione di TNF-α sono additivi a quelli indotti da una nota tossina batterica (LPS).
Conclusioni: I dati dimostrano che in corso di trattamento con DXR, lo stesso miocardio contribuisce alla propria tossicità con la produzione di questa citochina e suggeriscono l'utilità sia di monitorare i livelli di TNF-α sia di prevenirne l'incremento a scopo cardioprotettivo.
Referenze:1.Ganz WI. et Al.,Oncology,1996,53, 461.
2.Torre-Amione G. et Al, Drug, 2000, 59 (4), 745.
3.Feldman A.M. et Al, JACC, 2000, 35, n.3.

196

COMPARISON BETWEEN THE ANALYTICAL PERFORMANCES OF A FULLY AUTOMATED SYSTEM AND A POCT METHOD FOR PLASMA BNP MEASUREMENT

Storti S., Prontera C., Prati P., Fontani G., Giannelli I., Zucchelli G.C., Clerico A.

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Objective It was recently recommended that BNP assay should be included in the first step of the algorithm for diagnosis of heart failure; although the diagnostic accuracy of this test is still under evaluation. Aim of the present study is the evaluation and comparison of analytical performance and clinical results of two immunoassays for plasma BNP.
Methods We assayed 200 plasma samples of normal subjects and cardiac patients with a fully automated immunoassay (AxSYM Plus system, Abbott Diagnostic Division.) and a POCT method (TRIAGE BNP test, Biosite).
Results Within-run and total imprecision (CV%, tested by NCCLS guideline EP5-A) of AxSYM system were 18.4% and 19.8% at 21 pg/ml, 8.0% and 14.8% at 183 pg/ml, 5.7% and 14.0% at 319 pg/ml, respectively. For comparison, the imprecision profile of TRIAGE assay ranged from 11.8 to 17.9 % in the concentration interval of 5-1100 pg/ml, as previously tested in our laboratory (1). Analytical sensitivity of the two methods was comparable (about 8-10 pg/ml), as well as the turnaround time (about 20 min). A close linear relationship was found between the clinical results,of the two methods, considering the BNP concentration range from 5 to 5500 pg/ml (AxSYM = 48.95 + 1.17 TRIAGE, R = 0.948, n= 200), although a significant bias was found (mean difference: 84.9 pg/ml, 95% CL: 54.7 - 115.1 pg/ml, $p < 0.0001$). In particular, the mean BNP concentration measured in 66 plasma samples of healthy subjects was 32.3±50.6 pg/ml with AxSYM and 12.5±10.5 pg/ml with TRIAGE assay, respectively (mean difference= 19.9 pg/ml, p= 0.0004). Moreover, in 98 patients with cardiomyopathy, the mean BNP concentration measured by AxSYM was 448.7±640.0 pg/ml, and 328.7±558.9 pg/ml with TRIAGE, respectively (mean difference= 200.0 pg/ml, $p<0.0001$). However, a significant difference ($p<0.0001$), between the mean BNP value found in the group of normal subjects and that of patients, was shown with both methods.
Conclusion Our data indicate that the two BNP immunoassays show similar analytical performance. However, a significant difference between the clinical results resulting from these two tests was shown. These findings suggest that different normal ranges as well as cut-off values should be taken into account for the clinical use of these two assays.
Reference 1. Del Ry S, Giannessi D, Clerico A. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 446–50.

197

CARDIAC TROPONIN I: IMPACT OF DIFFERENT CUTOFF VALUES IN PATIENTS OF EMERGENCY DEPARTMENT WITH SUSPECTED MYOCARDIAL DAMAGE.

Moretti M.[(1)], Pieretti B.[(1)], Mauri R.[(1)], Gasperoni S.[(1)], Rocchi M.[(2)], Delprete E.[(1)]

[(1)] Laboratorio Analisi Ospedale S. Croce, Zona Territoriale N°3 Fano (PU); [(2)] Istituto di Biomatematica Università di Urbino

Background: Cardiac troponins, currently the most sensitive and specific biochemical markers of myocardial necrosis, play a pivot role in the diagnosis of myocardial damage. The most important scientific organizations have proposed different criteria to define cutoffs that separate normal and pathological values. We have considered the cutoff derived from receiver operating characteristics (ROC curve) for acute myocardial infarction (AMI), the cutoff corresponding at the 99th percentile value obtained from a reference population and the cutoff corresponding to a total imprecision (CV%) of 10%. The aim of this study is to evaluate the potential impact that the different cutoffs have in cardiac troponin I (cTnI) values obtained on Emergency Department patients with suspected myocardial damage.
Materials and Methods: All (cTnI) measurements have been performed in heparinized plasma specimens using Access AccuTnI (Beckman Coulter®) a paramagnetic particle chemiluminescent immunoassay. We analyzed 724 specimens on Emergency Department patients with suspected myocardial damage.
The cTnI cutoff values considered are:
0.5 μg/L: cutoff derived from ROC curve for AMI (96% sensibility and 94% specificity)
0.065 μg/L: corresponding to 10% CV
0.04 μg/L: 99th percentile of reference population
Results: The prevalence of cTnI-positive patients using the different cutoffs is:
3% using ROC cutoff (from 2,09 to 0,56μg/L)
21% using 10% CV% cutoff (from 0.46 to 0.06μg/L)
35% using the 99th percentile cutoff (from 0.059 to 0.04μg/L)
Conclusion: This study shows that using different cutoff values the cTnI-positive patients range from 3% to 35%. Currently clinical laboratories, also for the same assay, don't employ uniform cutoffs so the same result can be differently interpreted.
The cTnI cutoff value is a decisional limit rich of clinical, social and economic contents so we suggest to establish a unique criterion accepted by everyone.
In our laboratory we fixed a single decisional limit for myocardial damage, according to ESC/ACC and IFCC guidelines, corresponding to 10% CV. Our 10% CV, obtained in real operative settings, corresponds to 1.6 ratio versus the 99th percentile and is associated to a 1.5 % of analytical misclassification risk.
Lin JC et. al. Rates of positive cardiac troponin I and creatine kinase MB mass among patients hospitalized for suspected acute coronary syndromes. Clin Chem 2004;50:333-8

198

IL SIGNIFICATO DEL NT-proBNP NELLA SINDROME CORONARICA ACUTA (SCA) VALE ANCHE PER I PAZIENTI DI COMUNITA' ?

Tarantini L.*; Del Giudice G.; Roncada T.; Bellenzier M.; Olivotto F.; Rocchi A.; Palatini O.*; Russo P.*; Catania G.*

UOA Laboratorio Analisi Chim-clin e Microbiologia Pieve di Cadore (BL), * UOA Cardiologia Belluno.

PREMESSA E FINALITA': recenti studi da trials clinici randomizzati (TCR) e da centri cardiologici terziari universitari (CT) sottolineano che nella SCA i peptidi natriuretici cardiaci (PNC) predicono gli eventi clinici maggiori. E' tuttavia noto che i pazienti arruolati nei TCR e ricoverati nei CT possono differire sostanzialmente dai pz ricoverati negli ospedali di comunità per fattori quali età, sesso, comorbidità che condizionano il valore degli PNC. A tal fine abbiamo valutato se il valore prognostico PNC è trasferibile nei pz ricoverati nel nostro ospedale di comunità

MATERIALI E METODI: è stata esaminata una serie consecutiva di 127 pazienti [M/F: 84/43; età: 69.2 ± 12.5; Creatinina: 1.1 mg/dl ± 0.7, diabete: 26 (20%), Pregresso IMA: 22 (16.9%), esordio con scompenso: 24 (18%), Ipertrofia ventricolare Sin.: 83 (68%), BPCO: 19 (15%)] ricoverati per SCA presso l'unità coronarica di Belluno dall'1/1/2003 all'1/11/2003.

E' stato eseguito un prelievo ematico per la determinazione del NT-proBNP in 4ª giornata di degenza o ad avvenuta stabilizzazione clinica.

Sono stati conteggiati gli eventi (morte, ricoveri non programmati per cause cardiovascolari, by-pass aorto-coronarico urgenti) avvenuti fino al 31/12/03.

Il dosaggio sierico del peptide è stato eseguito con tecnologia in elettrochemiluminescenza (Elecsys proBNP su Elecsys 2010, Roche Diagnostics).

RISULTATI: sono stati riscontrati i seguenti valori di NT-proBNP: mediana 712 (range 32 – 33286 ng/l), 25°-75° percentile 271 – 2450 ng/l. I paz. con Nt-ProBNP > al 75° percentile hanno presentato nel follow-up un siginificativo maggior numero di eventi (log Rank:<0.0001 al Test di Kaplan Meyer).

Sono mostrati in tabella i fattori indipendenti predittivi gli end-points [analisi multivariata (T. Cox)].

Analisi Multivariata: Eventi	OR	IC
NT-proBNP>75° percentile	10.5	35-3.1
Numero dei Vasi	1.9	3.5-1.07

CONCLUSIONI: dal nostro studio risulta che nella SCA un alto valore di NT-proBNP (> 75° percentile) è un forte predittore della prognosi a breve termine anche nei pazienti della vita reale: anziani e con rilevanti comorbidità.

199

METODO RXL DIMENSION PER LA DETERMINAZIONE DELLA MIOGLOBINA: CONFRONTO TRA DUE GENERAZIONI

Mion M., Altinier S., Zaninotto M., Forni M., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

Di seguito vengono riportati i risultati del confronto dell'ultima generazione del metodo Dade Behring per la determinazione della mioglobina sullo strumento RxL Dimension (RMyo) con la versione precedente. Le determinazioni sono state eseguite su campioni di plasma litio eparina e le concentrazioni espresse in μg/L.

L'imprecisione, valutata su 20 determinazioni dei controlli Dade Behring (L1, L3) e di due pool di plasma (P1, P2), ha fornito coefficienti di variazione compresi tra 2.6 e 4.6 (media: 637.0 e 45.2 rispettivamente) nella serie e tra 3.8 e 5.7 (media: 622.6 e 43.9) tra serie. La stessa valutazione condotta con la versione precedente del metodo ha fornito CV% compresi tra 2.4 e 3.3 (media: 600.7, 45.5) nella serie, e tra 1.9 e 5.1 (media: 596.1, 44.7) tra serie.

Il confronto tra le due generazioni di metodi, eseguito su 136 campioni (intervallo di concentrazione: 14-916), ha fornito la seguente regressione lineare y=1.03x-2.33 (r=0.998), mentre l'analisi di Bland-Altman ha fornito un bias significativo=2.61 (95% IC: da 0.183 a 5.037). L'analisi statistica su campioni con concentrazioni <500 (n=121) ha fornito i seguenti risultati: RMyo=1.04x-3.63 (r=0.998), bias=1.16 (95% IC: da -0.184 a 2.51).

Confronto siero-plasma (n=50, intervallo di concentrazione: 24-231): plasma=1.006 siero+1.368 (r=0.9918), bias=1.84 (95% IC: da - 0.205 a 3.885).

La linearità è stata verificata analizzando 5 campioni in triplicato (concentrazioni medie comprese tra 216.67 e 1019.67), ottenendo un recupero compreso tra 99.39 e 93.55%.

La distribuzione dei valori nei soggetti sani, calcolata utilizzando 126 campioni, espressa come intervallo percentile 2.5-97.5 è risultata 24-84 (intervallo riportato sul foglietto illustrativo 10-92), con una differenza statisticamente significativa tra maschi (n=63, 31-89) e femmine (n=63, 22-57) (Mann Withney test p<0.001).

La valutazione dell'effetto gancio è stata condotta analizzando 6 campioni con concentrazioni di mioglobina comprese tra 35.000 e 220.000. In tutti i casi lo strumento ha evidenziato un segnale di allarme con la richiesta di diluire il campione. La versione precedente del metodo forniva sugli stessi campioni basse concentrazioni di mioglobina, senza nessun segnale di allarme. La nuova generazione del metodo fornisce prestazioni simili alla precedente relativamente all'imprecisione e alle concentrazioni misurate. L'intervallo di misura e la commutabilità dei campioni risultano conformi a quanto dichiarato dalla ditta. La risoluzione del problema legato all'effetto gancio ha reso questo metodo affidabile, oltre che nella diagnosi e nel monitoraggio di pazienti cardiopatici, anche nella gestione di pazienti con patologie della muscolatura scheletrica.

200

GRAVITA' DELLA MALATTIA E FATTORI NON CARDIOLOGICI INFLUENZANO I LIVELLI DI NT-proBNP NELLA SDR. CORONARICA ACUTA .

Tarantini L.*; Del Giudice G.; Roncada T.; Bellenzier M.; Olivotto F.; Rocchi A.; Palatini O.*; Riggi L.*; Catania G.*

UOA Laboratorio Analisi Chim-clin e Microbiologia Pieve di Cadore (BL), * UOA Cardiologia Belluno.

PREMESSA: nella Sindrome Coronarica Acuta (SCA) i peptidi natriuretici cardiaci (PNC) predicono la prognosi dei pazienti. E' tuttavia noto che la SCA non è un'entità clinica omogenea e che il livello ematico PNC è condizionato da altri fattori extra-cardiologici quali età, sesso, funzione renale.
FINALITA': scopo del presente lavoro è stato di valutare la relazione esistente tra livelli sierici del frammento N-Terminale del pro Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) e le variabili cliniche cardiologiche e non in una serie di pazienti di comunità ricoverati per SCA.
MATERIALI E METODI: sono stati considerati tutti i 127 pazienti (M/F: 84/43; età 69.2 ± 12.5) ricoverati consecutivamente per SCA dall'1/1/2003 all'1/11/2003 presso l'unità coronarica di Belluno. E' stato eseguito un prelievo ematico per la determinazione del NT-proBNP in 4ª giornata di degenza o ad avvenuta stabilizzazione clinica.
Il dosaggio sierico del peptide è stato eseguito con tecnologia in elettrochemiluminescenza (Elecsys pro BNP su Elecsys 2010, Roche Diagnostics).
RISULTATI: sono stati riscontrati i seguenti valori di NT-proBNP: media 3330±6894 ng/l, mediana 712 (range 32 – 33286 ng/l), 25°-75° percentile 271 – 2450 ng/l. All'analisi univariata (Analisi della varianza e test del Chi quadro) il valore di NT-proBNP (>75°p) correlava con la gravità della SCA (IMA anteriore, esordio con scompenso, frazione d'eiezione) ma anche con l'età, la funzione renale, la presenza di BPCO ed il fumo di sigaretta, l'indice di Charlson e la presenza d'ipertrofia ventricolare. All'analisi multivariata (Regressione logistica multipla) i fattori indipendenti correlati con elevati valori di ProBNP (> 75° percentile) sono risultati: l'età (OR 0.2; IC 95% 1.09-1.5; p=0.002), la creatininemia (OR 4.4; IC 95% 1.1-6.259; p=0.04), e l'IMA anteriore (OR 2.3; IC 95% 1.2-96.2; p=0.03).
CONCLUSIONI: dal nostro studio preliminare risulta che nella SCA l'età e la funzione renale, oltre che l'entità della SCA, condizionano significativamente i livelli sierici di NT-proBNP.

201

PERI-OPERATIVE REDUCTION OF HOMOCYSTEINE AND FOLATE AFTER CABG SURGERY

Storti S., Cerillo A.G., Parri M.S., Prati P., Vittorini S., Biagini A., Clerico A.

"G. Pasquinucci" Hospital, C.N.R. Institute of Clinical Physiology, Massa, Italy

Objective. Reactive oxygen species (ROS) play a major role in the pathophysiology of ischemia-reperfusion damage. The relative reduction-oxidation status of the cell depends primarily on the balance between concentrations of ROS and the cysteine-dependent antioxidant thiol buffer glutathione (GSH). The transsulfuration pathway, whose initial entering substrate is homocysteine (Hcy), converts methionine to cysteine, which is then converted to GSH. Metionine can also be resynthesized from Hcy.
We indirectly evaluated whether CABG may affect the trans-sulfuration pathway by measuring circulating levels of Hcy and folate.
Methods. 47 consecutive patients (aged 67.2±11years, 40/7 males/females) undergoing conventional CABG were enrolled. Serum samples in SST tubes, obtained at admission, at 0, 12, 48 and 120 hours after surgery, and after 6 months in a subgroup of 24 patients, were immediately put on ice, centrifuged and frozen at –20°C. All samples from the same patient were analyzed in the same session by AxSYM®(Abbott Laboratories, Abbott Park, USA), using Florescence Polarized Immuno-Assay for Hcy evaluation and a ionic capture system for folate measurement. Hemodilution occurring during CABG has been monitored by the evaluation of serum protein levels by CX7 (Beckman).
Results. A significant decrement of Hcy, folate and serum protein concentration was observed ($p<0.001$, by ANOVA for repeated measures). Mean basal Hcy concentration was 18.27±10.45 □mol/l, changed to the minimum 12 hours postoperatively (8.94±6.46) and returned near to basal after 48 hours (16.72±8.90) and here rested for 6 months (17.78±9.63). Mean basal folate level (4.42±1.54 ng/ml) changed reaching the minimum after 48 hours (2.26±0.83) and then increased only after six months (6.17±1.71). A negative correlation existed between Hcy and folate ($R2=0.07$, $p<0.0001$). Serum total proteins, decreasing from the basal value of 7.28±0.69 g/l, reached the minimum level (4.79±0.72) soon after the end of the surgical procedure, then returned to normal values only after 6 months (7.45 ± 0.61).
Discussion.. CABG surgery induces significant perioperative reduction of Hcy and folate concentrations, that remains significant independently from hemodilution. as assessed by multiple regression analysis This reduction may be due to the response versus oxidative stress developing during ischemia-reperfusion damage, as a consequence of the increased request for GSH to neutralize ROS.

Reference. Shelly C.L. FASEB J. 13,1169-1183,1999

202

PLASMA BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE LEVELS IN SEVERE PULMONARY HYPERTENSION

Albertini R.[1], Ghio S.[2], Vadacca G.B. [1], De Cerchio C.[1], Casotti M.[2], Martina C.[2], Magrini G.[2], Klersy C.[3], Campana C.[2], Tavazzi L.[2], Moratti R.[1]

Laboratory of Clinical Chemistry[1], Division of Cardiology[2], Biometry and Clinical Epidemiology[3], IRCCS S.Matteo Hospital, Pavia, Italy.

Recent studies have identified the role of biologically active molecules, such as neurohormones, as mediators of disease progression in CHF. The natriuretic peptides are a family of hormones which regulate blood pressure, electrolyte balance and fluid volume and include B-type natriuretic peptide (BNP) and other natriuretic peptides. BNP is a 32-aminoacid peptide which is secreted from the ventricles under conditions of sustained ventricular expansion and pressure overload. On the basis of these biochemical and physiological considerations, BNP assay has been shown to be useful in both diagnosis and staging of congestive heart failure. The aim of the study was to define whether the plasma levels of brain natriuretic peptide (BNP) and the ultrasound evaluation of right ventricular (RV) performance may predict functional capacity in patients with severe pulmonary hypertension. BNP was assayed by a chemiluminescence based enzyme immunoassay method (sandwich type EIA based on monoclonal antibodies for two epitopes of the BNP molecule) using an automated analytical system (Advia Centaur, Bayer Diagnostics, Tarrytown NY, USA). Precision of the method was determined in ten runs performed in replicates of 12; within-run and run-to-run precisions were 4.8% and 6% respectively, near the cut-off concentration (100 pg/ml). In 48 patients with primary or selected forms of non primary pulmonary hypertension, plasma BNP levels were measured and the following echocardiographic parameters of RV performance were assessed: tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), RV area change, Tei index, peak systolic velocity and peak strain in both basal and medium segments of the RV wall. Functional capacity was assessed by means of the 6 minutes hall walk test (6MWT). At univariate analysis, plasma BNP levels above 276 pg/ml and TAPSE below 15 mm significantly discriminated patients with a low exercise capacity (area under the receiver operating characteristic curve = 0.80, 95% confidence intervals 0.66-0.90 for BNP and 0.64, 95% confidence intervals 0.49-0.77 for TAPSE). At multivariate analysis only plasma BNP levels above 276 pg/ml was related to the distance covered during the 6MWT. In patients with severe pulmonary hypertension, high plasma BNP levels are a stronger predictor of impaired functional capacity than any echocardiographic indicator of RV dysfunction.

203

PLASMA HOMOCYSTEINE LEVELS IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

Ciaccio M.[1]; Guglielmini E.[1]; Bivona G.[1]; Labbozzetta M.[1]; Altavilla P.[1]; Scazzone C.[1]; Petrigni T.[1]; Miccichè S.[3]; Saia A.[1]; Vocca L.[1]; Li Vecchi M.[2].

[1]Cattedra di Biochimica Clinica, [2]Cattedra di Nefrologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo e [3]U.O. di Patologia Clinica, Ospedale Nuovo di Cefalù, Palermo.

Introduction: A increase in plasma total homocysteine (tHcy) is considered to be an independent risk factor for cardiovascular disease in the general population (1,2).
The prevalence of cardiovascular disease (CVD) is high in patients with chronic renal failure and CVD is the most common cause of death (about 50%) in these patients (3,4).
The aim of this study was to estimate serum levels of homocysteine in patients with chronic renal failure.
Patients and Methods: Plasma homocysteine levels were measured in 41 patients (34 males, age range 30-84 years; 7 females, age range 56-66 years) with chronic renal failure and 40 healthy controls (20 males, age range 30-70 years; 20 females, age range 45-65 years) were enrolled in our study. These values were determined by automatic analyzer for biological fluid assay (IMX System, Abbott S.p.A., Roma, Italy) FPIA (Fluorescence Polarization Immuno Assay).
Results: Mean value of homocysteinemia level in patients with chronic renal failure was 30.9 □mol/l (n.v. 5-11 □mol/l) with SD±12.7 among a mean value of 11.7 □mol/l (DS±1.7) in healthy controls.
Conclusions: Our study in patients with end-stage renal disease showed that more than 97% of the patients had elevated plasma tHcy levels, which were higher in patients with normal nutritional status than in malnourished patients.
References: 1) van den Brandhof W.E. et al.: The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis. Atherosclerosis, 2001; 157: 403-409. 2) de Koning A.B.L. et al.: Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. Clin. Biochem., 2003; 36: 431-441. 3) Abdel-Raheem M.M. et al.: Hyperhomocysteinemia and the risk of thromboembolic phenomen in patients with chronic renal failure. Thromb. Res., 2002; 105: 299-302. 4) Hermann W.: The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for disease: an overview. Clin. Chem. Lab. Med., 2001; 39: 666-674.

204

NUOVO METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLA MIOGLOBINA SU VITROS ECI

Mion M., Altinier S., Forni M., Zaninotto M., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

Scopo dello studio: valutare il nuovo metodo per la determinazione della mioglobina recentemente implementato sull'analizzatore VITROS Eci (Ortho-Clinical Diagnostics). Principio del metodo: sandwich con rivelazione in chemiluminescenza potenziata; intervallo di misura: 2-2000; tempo di risposta: 16 minuti circa. Tutte le determinazioni sono state condotte su plasma (litio eparina, μg/L). Studio di imprecisione: condotto utilizzando tre livelli di materiale di controllo (QC) e 6 pool (P). Imprecisione nella serie (n=10), media (CV%): QC1-61.9 (1.13), QC2-269.0 (1.12), QC3-629.0 (1.35), P1-28.5 (1.8), P3-132.3 (1.7). Imprecisione tra serie (QC, n=17; P, n=11): QC1-64.3 (3.0), QC2-276.3 (2.4), QC3-617.6 (4.0), P1-30.5 (2.3), P2-59.8 (3.2), P3-136.1 (3.5), P4-221.5 (2.2), P5-408.6 (2.7), P6-924.9 (3.6). Linearità: un pool con una concentrazione di mioglobina di circa il 30% superiore a 2000 (pool 0) è stato diluito ottenendo 5 pool (3:4, 1:2, 1:4, 1:5, 1:10) analizzati in doppio. "Valore osservato"="Valore atteso"×1.001 + 2.939, r=0.999, ("Valore atteso": calcolato dalla concentrazione del pool 0 stabilita dal valore medio della diluizione 3:4); test di Bland-Altman: bias (95 CI%)=3.62 (-5.757/12.997). Confronto tra metodi: n=58 campioni sono stati dosati su VITROS ECi (22.1-599.2) e sull'analizzatore Dimension RxL (Dade Behring) (19.0-599.0); VITROS Eci=0.991 Dimension RxL-1.446, r=0.992; test di Bland-Altman: bias (95 CI%)=-3.448 (-9.343/2.446). "L'effetto gancio" non è stato osservato testando 5 campioni con concentrazione di mioglobina elevata (11990-84750). Le prestazioni del metodo in presenza dei più comuni interferenti [fattore reumatoide (FR) (n=10) (275-2830 kIU/L), emoglobina (E) (n=10), (>2 g/L), bilirubina (B) (n=13) (38.6-446.6 μmol/L), trigliceridi (T) (n=11) (3.5-10.08 mmol/L), anticorpi eterofili (A) (n=1), human anti mouse antibodies (H) (n=2 plasma sodio citrato) (100, 585 μg/L)] sono state verificate su VITROS Eci e su Dimension Rxl: in presenza di T e B, è stato osservato un differente comportamento tra i due metodi in funzione della concentrazione di mioglobina, sebbene il bias (Bland-Altman) non sia risultato statisticamente significativo. Nei campioni A e H, i livelli di mioglobina osservati sono risultati inferiori al limite superiore dell'intervallo di riferimento di ciascun metodo. Il metodo valutato presenta complessivamente caratteristiche analitiche soddisfacenti. Completando inoltre il pannello dei marcatori cardiaci già presente sull'analizzatore ne favorisce ulteriormente l'impiego nella gestione del paziente con ACS.

205

WITH ACUTE CORONARY SYNDROMES, WITH OR WITHOUT RENAL DYSFUNCTION TROPONIN LEVELS DETERMINATION IN PATIENTS

°Rossi C., °Scatena R.,*Covino M., *Carbone L., *Lavosi M., °De Sole P.

°Istituto di Biochimica Clinica - *Dipartimento Emergenza, Università Cattolica del Sacro Cuore – Roma

Background. Troponin (TPN) levels play an important diagnostic and prognostic role in patients with Acute Coronary Syndromes (ACS). However, since TPN is cleared by the kidney, there is increasing evidence that renal dysfunction may impair TPN levels determination, diminishing its diagnostic and prognostic value.
Aim. Aim of this study was to assess TPN levels differences in ACS patients with or without renal dysfunction.
Methods. Study population consisted of 1290 patients with ACS: 815 had a diagnosis of acute myocardial infarction, and 475 a diagnosis of unstable angina or NSTEMI. Patients were divided in two groups according to serum creatinine (CR) determination. In group 1 (1156 cases) were included patients that had, in repeated samples, CR levels always lower than 1.4 mg/dl; in group 2 were included patients with CR levels always higher than 1.4mg/dl. We statistically compared, among these two groups, clinical data (age, sex, in in-hospital rate of ventricular fibrillation and cardiac arrest, in-hospital mortality, length of hospital staying), and laboratory findings (TPN minimum, maximum, and mean levels; value of first and second TPN determination, and absolute difference value between first and second TPN determination; LDH, total creatinkinase, and MB-creatinkinase mean values).
Results. Among our cohort of patients with ACS, patients with renal dysfunction had a significantly higher age ($p<.01$), length of hospital stay ($p<.01$), cardiac arrest rate ($p<0.01$), and mortality ($p<0.01$). These patients had also significantly higher TPN minimum, maximum and mean levels ($p<0.01$ for all). Interestingly both in first and second determination, TPN levels were significantly higher in renal dysfunction patients ($p<0.01$ for both), while absolute mean difference among first and second determination did not significantly differ. Patients with renal dysfunction had higher LDH levels ($p<0.01$), while total and MB creatinkinase levels did not significantly differed in the two groups ($p=0.07$ and $p=0.67$ respectively).
Conclusion. In ACS, patients with renal dysfunction have TPN levels higher than patients with normal renal function. However the acute increase of TPN level in the clinical course seems to be similar in the two groups.
Ref. Prognostic implications of abnormalities in renal function in patients with acute coronary syndromes. Circulation 2002;106:974

206

EVALUATION OF INNOTRAC AIO!™ 2nd GENERATION CARDIAC TROPONIN I (cTnI) ASSAY

Pagani F., Stefini F., Panteghini M.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia

Cardiac troponin has been designated as the preferred biomarker for diagnosis of myocardial infarction (MI). However, published data confirm a large diversity among commercially available troponin assays with respect to important analytical aspects and underscore the need for introduction of improved assays. Results obtained with recently released next-generation assays shows that there is substantial improvement in the analytical performance offered by the newer assays. In this study we evaluated one of these next-generation cTnI assays, performed on the Innotrac Aio! immunoanalyzer (A. De Mori Strumenti). The assay is based on "all-in-one" dry chemistry technology, in which all the reagents are pre-coated in assay cups, and time-resolved fluorimetric detection. Samples (20 μL) can be whole blood, plasma, or serum with a total analysis time of <20 min. The assay demonstrated a detection limit (mean+3SD of 20 replicates of the cTnI-free diluent) of 0.006 μg/L. Five cTnI-positive sera (native cTnI, 5 to 80 μg/L) were serially diluted with a cTnI negative (i.e. <0.01 μg/L) serum pool or with the instrument buffer solution. Four separate dilutions (3:4, 1:2, 1:4, 1:8) were assayed in duplicate and the curves obtained tested for linearity. After demonstration of linearity, linear regression analysis and correlation coefficients (r) were calculated. For all samples, the hypothesis of a linear fit was accepted (P >0.1). r were >0.9989 (dilution with negative pool) and >0.9978 (dilution with buffer), respectively. For the imprecision study, 7 serum pools were prepared and stored at –80°C until used. Two replicate/specimen per run and one run per day for 20 days, by including two reagent lots and calibrations, were performed. The following results were obtained (mean cTnI, μg/L, and total CV, calculated using ANOVA method as described in NCCLS EP5-A document): 0.019, 14.2%; 0.044, 8.2%; 0.065, 6.3%; 0.086, 6.3%; 0.14, 8.1%; 0.22, 6.0%; 0.39, 4.3%. Since a total CV ≤10% at the MI decision limit is recommended, the cTnI concentration corresponding to this imprecision was calculated by interpolating the imprecision profile obtained from previous data. The lowest cTnI concentration yielding a 10% CV was 0.036 μg/L. To establish reference values, sera from 150 apparently healthy individuals were obtained. 97% of cTnI values in these subjects were <0.01 μg/L, whereas four subjects showed a measurable cTnI concentration. The calculated 99th percentile of the cTnI value distribution was 0.015 μg/L. In conclusion, the Aio! 2nd-generation cTnI assay revealed improved performance and was close to meet the 10% CV at 99th percentile value, demonstrating a 10%/99th ratio of 2.4.

207

VALUTAZIONE DELL'OMOCISTEINA NELL'IMA E NELLA VASCULOPATIA CEREBRALE

Cancellieri E., Ripari A., Cresci L., Montanelli A.

Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda " Ospedale Maggiore di Crema", Crema

Numerosi lavori pubblicati in letteratura hanno mostrato che un moderato aumento delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina è associato ad una elevata prevalenza di malattie vascolari sia coronariche che extracoronariche ed hanno permesso di concludere che l'omocisteina è un fattore di rischio indipendente per aterosclerosi, di rilevanza tutt'altro che trascurabile rispetto a quella di altri più comuni fattori di rischio.

SCOPO DEL LAVORO. Esprimere una valutazione sulla correlazione tra i valori di omocisteina e la malattia cardiaca e/o la malattia cerebrovascolare.

MATERIALI E METODI. Nel corso del 2003 abbiamo valutato l'omocisteina totale plasmatica in un gruppo di 24 pazienti infartuati (2 femmine e 22 maschi, di età compresa tra 37 e 54 anni) e in 83 pazienti affetti da vasculopatia cerebrale (43 femmine e 40 maschi, di eta' compresa tra 20 e 70 anni). Tutti i pazienti, reclutati presso i reparti di Cardiologia e Neurologia della nostra Azienda Ospedaliera, hanno effettuato il test per l'omocisteina al momento del ricovero e prima di essere sottoposti a qualsiasi trattamento farmacologico. Il sangue, raccolto in provette con EDTA, era immediatamente centrifugato, separato e congelato a -40°C. L'analisi era eseguita settimanalmente su strumentazione automatica e con kit commerciali (CENTAUR ; Omocisteina Ready-pack Bayer)

RISULTATI. Le indagini effettuate hanno evidenziato valori moderatamente aumentati di omocisteina (da 16 μmol/l a 30 μmol/l) nel 26% dei soggetti affetti da IMA e nel 6,6% dei soggetti affetti da vasculopatia cerebrale.

CONCLUSIONI. I nostri dati, relativi ai pazienti con IMA, concordano con quelli degli studi pubblicati sull'argomento : l'omocisteina sembra costituire un rilevante fattore di rischio associato alle complicanze cardiologiche dell'aterosclerosi. In merito ai pazienti affetti da patologia cerebrale, diversamente da quanto si evince dalla letteratura, la nostra casistica mostra una prevalenza di iperomocisteinemia non significativamente diversa da quella riscontrata nella popolazione generale. Questa differenza può forse essere giustificata dal nostro reclutamento non selettivo, non rivolto esclusivamente ai casi di stroke, ma alla patologia cerebrovascolare in generale. Il ruolo dell'iperomocisteinemia nella patogenesi degli eventi cardiovascolari a carico dei diversi distretti arteriosi merita certamente ulteriori chiarimenti.

BIBLIOGRAFIA

Van Guldener C, Stehouwer CDA.
Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endotelial dysfunction.
Sem Thromb Hemost 2000;26:281-289.

208

UTILITA' DEL CEA NELLA DIAGNOSI PRECOCE DI RECIDIVA E NELLA PROGNOSI DEL CARCINOMA DEL COLON E DEL RETTO

Stocchi O.; Bianchi G.

U.O. Laboratorio Analisi Ospedale di Urbino – ASUR Zona Territoriale N.2 - URBINO (PU)

Il CEA rappresenta un valido marcatore per il tumore del grosso intestino e del retto. La sua utilità non si manifesta nella fase diagnostica bensì nella: 1) diagnosi precoce della recidiva; 2) staging, quindi prognosi. Spesso il CEA è l'unico marker presente in concentrazioni elevate in neoplasie di tessuti diversi come il polmone, la mammella, il pancreas etc.
In questo lavoro è stata valutata anche la performance analitica del sistema Architect Abbott nel dosaggio del CEA. A tal fine sono stati esaminati i seguenti parametri: precisione, accuratezza, sensibilità, linearità. E' stato inoltre valutato il grado di correlazione con un altro sistema analitico in chemiluminescenza, Liaison (BYK-SANGTEC). La correlazione è stata valutata sugli stessi campioni di siero provenienti da una popolazione di 26 pazienti (M 7; F19) affetti da patologia neoplastica. Si tratta di una popolazione eterogenea per: età; trattamento chirurgico; chemioterapia; metastasi. E' stato condotto anche uno studio clinico, in pazienti affetti da carcinoma del colon e del retto, per valutare l'andamento del CEA sia prima che dopo l'intervento chirurgico.
I risultati ottenuti con Architect sono stati i seguenti: ripetibilità CV 1,82%; DS 0,363; riproducibilità su 3 livelli: basso CV 4,0% DS 0,2; medio CV 3,8% DS 1,4; alto CV 5,5% DS 3,8; accuratezza BIAS +2%; linearità recupero medio 103%; correlazione r=0,991.
Il sistema analitico si è rivelato preciso, accurato e lineare. Il confronto dei risultati ottenuti con i due sistemi ha evidenziato un ottimo coefficiente di correlazione.
Lo studio clinico dei pazienti monitorati nel tempo dimostra che il dosaggio del CEA è utilissimo per fare diagnosi precoce di recidiva e/o metastasi. Infatti in un paziente con valori pre operatori normali, l'innalzamento del CEA dopo intervento chirurgico, ha preceduto di alcuni mesi la conferma endoscopica ed ecografia di recidiva e metastasi. Al contrario si dimostra di scarsa utilità clinica nella diagnosi iniziale di neoplasia; solo in un caso si sono registrati valori elevati prima dell'intervento chirurgico, evento che riveste un significato prognostico sfavorevole. Infatti l'esame istologico del prelievo bioptico ha evidenziato il 4° stadio di Dukes. Anche in questo caso il progressivo innalzamento del CEA post intervento si è rivelato una spia di metastatizzazione.

209

CONFRONTO DI MARKERS TUMORALI HER2 E CA.15-3 NEL FOLLOW-UP DELLA PATOLOGIA MAMMARIA.

Ruffini I., Procida E., Tucci E., Carosella R.

ASL- Chieti, Ospedale G.Bernabeo. Ortona
Laboratorio Analisi

Negli ultimi anni sono stati identificati in laboratorio nuovi target molecolari specifici che potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche specifiche contro il carcinoma della mammella. I markers che abbiamo voluto confrontare nel presente studio preliminare sono stati il Ca.15-3 ed HER2.
Il primo è una mucina glicoproteica ad alto peso molecolare presente nelle cellule del carcinoma mammario che viene misurato soprattutto nel follow-up delle neoplasie della mammella.
Il secondo è una glicoproteina di transmembrana con attività tirosin-chinasica E' normalmente espresso in tutte le cellule epiteliali ed è associata carcinomi della mammella, in una percentuale che va dal 10 al 34%.

MATERIALI e METODI

Abbiamo valutato contemporaneamente nel siero il Ca.15-3 e l'HER2 in 35 pazienti: 22 con diagnosi di ca. mammella e 13 con diagnosi di fibroadenoma e come controllo abbiamo individuato pazienti che dopo prelievo bioptico sono risultati negativi per le due patologie precedentemente indicate.
Il dosaggio del Ca.15-3 è stato eseguito in Elisa con Kit della ditta Eurogenetics , mentre l'HER 2, sempre in Elisa, della ditta Bayer Diagnostics.

RISULTATI e CONCLUSIONI

I risultati ottenuti del Ca.15-3 e del HER2 sono risultati nella seguente tabella

N° pazienti	Ca 15-3 v.n. 0-5 U/ml	HER.2 v.n. 0-10 ng/ml
25 controlli	Xmedio 18 U/ml	Xmedio 5.5 ng/ml
22 Ca mammella	Xmedio 34 U/ml	Xmedio 11.4 ng/ml
13 fibroadenoma	Xmedio 16 U/ml	Xmedio 8.1 ng/ml

I dati di questo studio preliminare indicano che questi due marcatori, come confermato dalla letteratura (1) possono essere utilizzati per il follow-up delle neoplasie mammarie al pari di altri marcatori, ma attualmente non ci sembra poter asserire che vi sia una specificità "tumore specifica " tale da determinare l'utilizzo degli stessi per una diagnosi.

BIBIOGRAFIA

S., Tan LK., Chen B. Her-2/neu and breast cancer. Diagn Mol Pathol 2001; 10:139-152.

210

UTILITÀ CLINICA E VALORI DI RIFERIMENTO PER LA PSA VELOCITY (PSAV)

Rubeca T., Ciatto S.

Centro per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, Firenze

Tra le varie forme di "aggiustamento" del PSA (range età specifico, densità PSA, rapporto PSA libero/totale) è stata proposta la variazione del PSA nel tempo (PSAV). Tradizionalmente, il cut off predittivo di lesione maligna è > 0.75 ng/ml/anno (1). La PSAV, peraltro, crea alcuni problemi: a) l'evidenza che definisce il cut off di 0.75 ng/ml/anno si basa su una casistica esigua, b) l'intervallo su cui è misurata la variazione deve essere lungo (almeno 6 mesi) perché su intervalli brevi la variazione analitica, circadiana e biologica possono inficiare la valutazione, c) osservazioni su popolazione sana (1648 soggetti negativi allo screening, intervallo quadriennale: Ciatto et al., Int J Biol Markers 2002;17:79) suggeriscono un cut off di normalità molto più basso (media 0.07 ng/ml/anno, LC95% 0.05-0.09) e la scarsa utilità clinica del cut off classico di 0.75 ng/ml/anno (specificità 97.5%, sensibilità 55.5%).
Poiché l'utilità della PSAV sta soprattutto nell'indicare o meno la biopsia in casi di incerta diagnosi, ne abbiamo verificato la performance in una serie consecutiva di 266 biopsie (70 carcinomi, 18 PIN, 178 benignità). Per evitare quanto più possibile l'inclusione di casi falsi negativi, sono state valutate solo biopsie benigne random a sestante. Per garantire la stabilità dei valori di PSA, la PSAV è stata determinata su un intervallo variabile da 6 a 62 mesi (media 42.5). Le PIN sono state escluse per il significato incerto quanto ad attribuzione come negativo o positivo. Il PSA è stato determinato con metodica Hybritech in tutti i casi.

cut off (ng/ml/anno)	sensibilità	specificità
<0	0.91	0.14
<0.10	0.91	0.21
<0.20	0.85	0.28
<0.50	0.72	0.46
<1	0.51	0.76
<2	0.31	0.91

Pur testando diversi cut off di PSAV, la sua accuratezza è risultata del tutto deludente. In particolare il cut off tradizionale di 0.75 ng/ml/anno è risultato associato a una sensibilità del 60% e a una specificità del 65% ! I risultati non variano anche dopo esclusione dei casi con PSA totale >10 ng/ml, comunque con elevato valore predittivo positivo e nei quali resta indicata la biopsia.
In conclusione non sembra che la PSAV sia di grande utilità nel differenziare le lesioni prostatiche benigne da quelle maligne, per lo meno non in modo clinicamente affidabile. In particolare, il cut off convenzionale di 0.75 ng/ml/anno appare associato ad una sensibilità e ad una specificità inaccettabili, e non dovrebbe essere più impiegato nella pratica clinica

Bibliografia
1. Carter HB et al., JAMA 1992;267:2215

211

PERFORMANCE OF A HIGHLY-SENSITIVE CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY FOR THYROGLOBULIN MEASUREMENT

Iervasi A, Iervasi G, Bottoni A, Boni G, Annicchiarico C, Di Cecco P, Zucchelli GC

CNR, Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

It is worldwide recognized that circulating Thyroglobulin (Tg) determination represents a fundamental tool in the management and follow-up of patients affected by differentiated thyroid cancer (DTC). Despite the large clinical use of Tg measurement, wide differences still remain between results produced with different methods. The aim of the present study was to evaluate the analytical and clinical performance of a recently introduced fully automated chemiluminescent immunoassay (Access analyzer, Beckman Coulter, USA) based on 4 monoclonal antibodies which produced results in 40 minutes. Analytical sensitivity (0.01 microg/L) was computed from 20 replicates of zero calibrator and of "Tg-free" serum sample. The imprecision profile (CVs), was: 22.9% at 0.059 microg/L, 11.6% at 0.15 microg/L, 9.0% at 0.30 microg/L, 8.5% at 0.64 microg/L, 8.3% at 0.89 microg/L, 6.8% at 3.1 microg/L, 6.6% at 9.8 microg/L, 4.3% at 36.4 microg/L, 4.3% at 66.5 microg/L, 4.2% at 165 microg/L; functional sensitivity was found 0.08 microg/L at 20 CV% and 0.24 microg/L at 10 CV%. Reliability of the measurements in the low concentration range (<1 microg/L) has been checked by progressively diluting, with "Tg-free" serum, a pool at 5.27 microg/L; measured values were very close to the expected values (recovery 100-133%). Comparison between results of Tg Access and other widely adopted assays was carried out obtaining the following Deming regressions: TgAccess=0.006+0.71TgImmulite, n=107, r=0.96, p<0.001; TgAccess=-1.1+0.61TgPasteur, n=64, r=0.99, p<0.001. Cut-off at 99th percentile of 53 DTC stage I "disease-free" treated patients (47 women and 6 men, 53±14 years), resulted 0.16 microg/L; in 5 patients Tg was <0.01 microg/L whereas in 48 patients Tg was measurable up to 0.19 microg/L. Tg measurement in basal condition during suppressive L-Thyroxine therapy and 5 days after rh-TSH (human recombinant TSH) stimulation was performed in 22 consecutive unselected DTC patients. In 68% of patients basal Tg was <0.1 microg/L and in 80% of these remained <0.1 microg/L also after stimulation, anyway in the other 20% remained <1 microg/L. These preliminary findings show the high sensitivity of Tg Access assay in the follow-up of low-risk DTC patients not only after rh-TSH stimulation but also during suppressive L-Thyroxine therapy when Tg values were very low. Our results indicate the optimal analytical and clinical performance of the Tg Access immunoassay which represents an improvement in terms of analytical sensitivity and precision when compared to the most widely employed assays; moreover the very good praticability makes easier its routinary application. Further retrospective and prospective studies in large series of patients treated for DTC will indicate its real usefulness in clinical practice.

212

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR SERUM LEVELS AND PROGNOSTIC VALUE IN MALIGNANT GLIOMAS.

Divella R., Lolli I, Foglia Manzillo E., ♦Crollo R, *Troccoli V, *Occhiogrosso G., Melpignano L., Ruggieri N., Troccoli G.

Chair and U.O Clinical Oncology, *Chair and U.O. Neurosurgery, ♦Chair and U.O Immunology-University of Bari - Italy

Introduction: Cancer cells exhibit unrestricted growth as a result of a complex imbalance between cellular proliferation and programmed cell death. These processes are controlled by cell membrane receptors, and their associated signal trasducing proteins. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a member of a family of cell membrane receptors that use tyrosine kinase activity as the signal transduction mechanism(1). Extensive studies show that EGFR is commonly expressed or overexpressed by many tumours (gastric, breast, glioma, lung) and correlates with disease progression and poor clinical prognosis(2). Increased EGFR expression might therefore be a strong prognostic feature in multiple tumour types, and the inhibition of its cellular actions may produce substantial therapeutic benefit. Aim of this study was to estimate the EGFR serum concentration for potential usefulness as a biological marker of brain cancer to prediction of prognosis and follow-up after treatment.
Materials and methods: serum samples from 59 glioma patients (pts), 31 Glioblastoma (GBM) and 28 Anaplastic Astrocitoma (AA) were collected before treatment. The control group (N=30) was selected from healthy individuals. All serum samples were assayed for EGFR ECD (extracellular domain) serum concentrations by a sandwich ELISA (EGFR Microtiter ELISA, DakoCytomation). Overall survival (OS) was calculated using Kaplan-Meier Method. OS was defined as the time from the day of diagnosis to death; data on survivors were censored at the last follow-up.
Results: main age was 59.5 years (range 27-81); mean±SD serum level for EGFR in 23/31 GBM (88±45 ng/mL) and in 19/28 AA pts (67±17 ng/mL) were significantly elevated (respectively P=0.0001 and P=0.0002) when compared with that of healthy controls (47±30 ng/mL). P=0.04 was found when compared GBM and AA pts mean serum values. For all pts, OS was 13 months, 18 months for AA and 12.5 for GBM. 43 pts, 19 AA and 23 GBM with high EGFR serum concentrations were associated with significantly reduced survival, OS=11.5 months (P=0.01), 14.5 months AA, 10.5 GBM.
Conclusions: serum EGFR was elevated in a significant proportion of brain cancer pts and associated with poor OS. Although a prospective study with large sample size is warrented, serum EGFR ECD may have a potential usefulness as a biological marker of gliomas for prediction of prognosis and follow-up after treatment.
References: 1) J. Baselga. Why the EGFR? The rationale for cancer therapy. The Oncologist, 2002; 7 (S4):2-8.
2) M.J Oh, J.H. Choi, I. HoKim, & al. Detection of EGFR in the serum of patients with cervical cancer. Cli. Cancer Res., 2000; 6 (4760-4763).

213

IL CA 27.29 NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA.

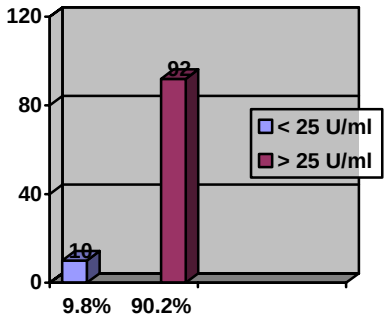
Savini Fabio^, Polidori Maria^^, Tucci Enzo^^, Ruffini Irma^^, Giovanetti Cristiana^ e Nubile Giuseppe^^.

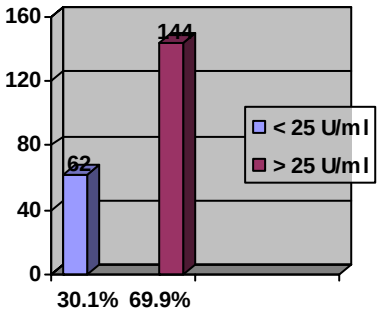
^^ Ospedale "S.Barnabeo" Ortona (Ch), USL Chieti.
^ Ospedale ".S.Massimo" Penne (Pe), USL Pescara

Il CA 27.29 appartiene alla famiglia dei marker tumorali muscarinici come ad esempio il CA 15,3, il CA 125, il CA 19,9. Nel nostro laboratorio abbiamo effettuato il dosaggio su n° 1050 pazienti, così suddivisi in base all'anamnesi ed all'esame istologico dei prelievi bioptici:

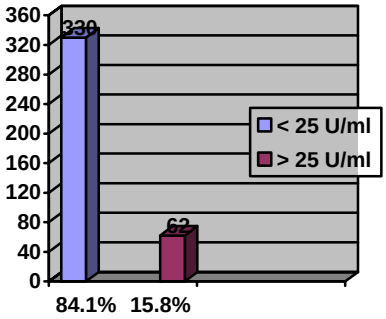
Carcinoma Mammario n° 308 casi		Patologie Infiammatorie o degenerative non cancerose n° 392 casi	
Premenopausa n° 102	Postmenopausa n° 206	Premenopausa n° 162	Postmenopausa n° 230
Controlli Sani n° 350 casi			
Premenopausa n° 170	Postmenopausa n° 180		

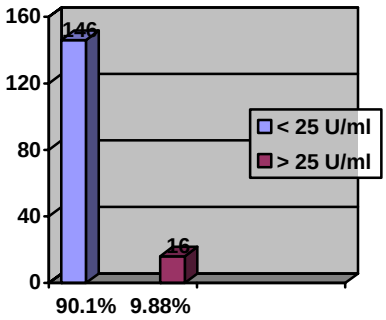
Per la determinazione del CA 27.29, abbiamo utilizzato un kit (anticorpo monoclonale di topo anti CA 27.29) immunoenzimatico (AIA PACK 27.29) che riconosce 8 amminoacidi nella porzione di tandem ripetuta nella catena polipeptidica (1). Sul gruppo di pazienti con Carcinoma Mammario abbiamo ottenuto i seguenti risultati (cut off = 25 U/ml)



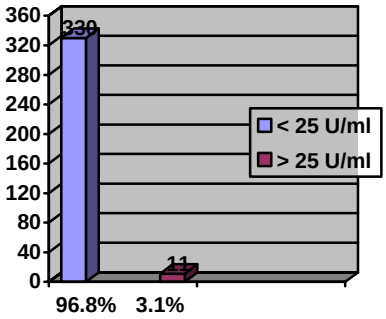


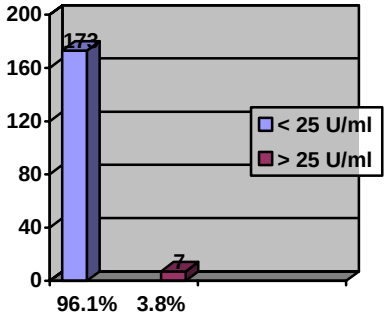
Sul gruppo di pazienti con patologia infiammatoria o degenerativa abbiamo ottenuto i seguenti risultati (cut off = 25 U/ml)





Sul gruppo di pazienti sani abbiamo ottenuto i seguenti risultati (cut off = 25 U/ml)





Alla luce dei risultati preliminari ottenuti nel presente studio, il CA 27.29 può essere inserito fra i marcatori tumorali del carcinoma della mammella come ulteriore ausilio diagnostico. I dati ottenuti, hanno inoltre evidenziato che questa indagine per avere un significato sia prognostico sia diagnostico, deve essere eseguita previa "attenta" anamnesi del paziente. Ad esempio la divisione in classi dei pazienti tra pre e post menopausa ha determinato una significativa ($p<0.001$) differenza tra i i gruppi di patologie in esame. Come altri marcatori il CA 27.29 è anche utilizzabile nella evoluzione clinica del carcinoma della mammella in quanto può evidenziare in maniera abbastanza precoce le recidive. In conclusione la correlazione statistica dei dati ha dimostrato una correlazione significativa del valore sia diagnostico sia prognostico ed una validità biologica nella progressione tumorale.

1) Kufe, D.G. Inghirami, M., Abe D., Hayes H., Wheeler H and Schlom H.. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benigh brest tumors. Hybridoma 3,223-226, 1984.

214

PSORIASIS IS A POSSIBLE CAUSE OF INCREASED LEVELS OF S-100B IN MELANOMA FOLLOW UP.

Scribano D., Forni F., Persichilli S., De Michele T., Guidi B.*, Diociaiuti A.*, Paradisi A*., Zappacosta B., Capizzi R* Amerio PL*, Giardina B.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Istituto di Dermatologia*. Università Cattolica del S.Cuore, Roma.

Elevated serum values of S-100B protein have been reported as a first sign of tumour progression in melanoma patients, but other clinical conditions have been associated with high serological levels of the protein, so they are considered as exclusion criteria for the S-100 dosage in the follow up of melanoma patients. The aim of our study is to verify: 1) if cutaneous inflammatory diseases, in particular psoriasis, may positively interfere in the follow up of melanoma; 2) if S-100B may be considered as a marker of specific cutaneous flogosis for monitoring the disease evolution and the treatment response. We have analysed serum samples from 364 dermatological patients (25 with diffuse dermatosis, 250 with psoriasis, 89 with cutaneous melanoma) using the luminescent immunoassay LIAISON Sangtec100 on Liaison analyzer (Diasorin). None of the patients had other causes of S-100 increase, like stroke, kidney diseases or other neoplasms. The cut-off level of 0,15 µg/l had been chosen on the basis of an our previous study on blood donors.
RESULTS In our study S-100 protein significantly increases in psoriasis patients, according to the extension and the grading of the disease.
PASI < 8: number of patients 116, median value: 0,06 µg/l (2.5% percentile: 0.02µg/l 97.5% percentile: 0.126µg/l) PASI between 8-12: number of patients 93, median value: 0,09 µg/ (2.5% percentile: 0.03µg/l 97.5% percentile: 0.211µg/l) PASI > 12: number of patients 41, median value: 0,20 µg/l l (2.5% percentile: 0.07µg/l 97.5% percentile: 1.09µg/l)
The differences among the three groups of psoriasis patients are all statistically significative (Mann Whitney test: P < 0, 0001). On the contrary, there are not differences between serum levels of S-100 in psoriasis and other diffuse dermatosis. Moreover, the statistical analysis has evidenced like S-100 protein arises at the same levels in patients with mild and severe psoriasis and in those with III and IV stage melanoma (median value: 0, 29 µg/l range: 0,06 – 15,50 µg/l P value: 0,71). However, we have observed a statistically significative difference between psoriasis patients with PASI < 8 and those with I stage melanoma (median value: 0,09 µg/l range: 0,02 – 2,13 µg/l P value: 0,0002). **CONCLUSIONS**: our results show that S-100 level may be affected by the presence of cutaneous inflammatory diseases and it reflects their severity and extention: for this reason, S-100 can lose its specificity in melanoma's follow-up.

215

ALIMENTARY HABITS AND IRON DEFICIT IN NO ELITE FEMALE ATHLETES

Casabellata G.[1]; Savonitto M. M. [2]; Guatto E. [1], Di Santolo M. [1], and Cauci S.[1]

[1]Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, e [2]Corso di Laurea in Scienze Motorie; Università di UDINE, ITALY.

Female athletes in fertile age are much more likely than male athletes to have iron deficit. However, scanty of data are currently available on iron deficit in no elite athletes. Furthermore, no up date data are available on alimentary habits (including smoking, alcohol, coffee) in Italian female athletes performing an average of 10 hours exercise per week at not professional level.
Our aim is to determine prevalence of iron deficit and/or anemia, concurrently with alimentary habits in non elite athletes.
81 non-pregnant Italian women aged 18-39 were enrolled mainly among volleybas and basket non professional athletes performing more than 8h exercise per week.
After informed consent samples of venous blood were retrieved to obtain complete hematogram results including ferritin and sTfR measurements. Women were given a detailed questionnaire about alimentary and lifestyle habits to be filled daily for a total of 14 days.
Anemia (Hb <12g/100mL) was present in 17% of athletes. Iron deficit (ferritin <10ng/mL) was diagnosed in 22% of female athletes.
No one of the enrolled women was strictly vegetarian. Iron deficit was not associated with total amount of meat however, it was associated with a higher proportion of having white meat. Hours of exercise per week were significantly associated with increased yogurt and decreased coffee consumption. Notably, cigarette smoking was positively associated with coke drinking and inversely related to amount of fruit.

216

SERUM LEVELS OF EPO AND STFR IN ELITE ATHLETES

Abellan R.[1], Ventura R. [1], Pellegrini M. [2],Marchei E[2]., Pichini S. [2], Pascual J.A[1].,. Bellver M[3],. Olive R.[3], Pacifici R. [2], Zuccaro P. [2], Segura J. [1].

[1,] Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain
[2] Clinical Biochemistry Dept. Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy;
[3] Centre d'Alt Rendiment, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain

Measurement of serum erythropoietin (EPO) and soluble transferrin receptor (sTfR) have been proposed as indirect biomarkers for the detection of recombinant human EPO misuse in sport. To investigate if physiological conditions or training event (intensity of training, competition stress) could affect levels of these biomarkers, serum EPO and sTfR were measured in elite and young non-competitive athletes .
Serum levels of EPO and sTfR were measured using a chemiluminescent immunoassay kit (Immulite) and a nephelometric immunoassay kit, respectively; in case of triathlon elite athletes an ELISA assay kit for each biomarker was used.
In young non-competitive athletes, no gender differences were found in serum levels of EPO (9.4±2.2 and 12.7±4.7 IU/L, for males and females respectively) or sTfR (1.5±0.2 and 1.4±0.3 mg/L, for males and females respectively).
EPO levels in basal, training and competition conditions were: 11.2±3.7, 9.8±2.1 and 9.9±4.6 IU/L for taek kwon do athletes respectively; and 15.7±5.8, 11.5±1.0 and 12.2±4.1 IU/L for swimming athletes respectively.
sTfR levels in basal, training and competition conditions were: 1.7±0.3, 1.6±0.3 and 1.6±0.2 mg/L for taek kwon do athletes ,respectively; 1.4±0.2, 1.4±0.1 and 1.6±0.3 mg/L for swimming athletes, respectively; 1.6±0.2, 1.7±0.3 and 1.6±0.3 mg/L for weightlifting athletes respectively. For athletes of synchronized swimming (sTfR levels in basal and training conditions were: 1.5±0.4 and 1.4±0.4 mg/L, respectively. Only statistical differences were found when comparing the three conditions in swimming elite athlete group.

R. Ventura et al. Evaluation of immunoassays for the measurement of sTfR in serum samples. Clin. Chem. Lab. Med. 2003; 41, Special Supplement, pp S534.

217

PRE- AND POST-RACE SERUM LEVELS OF EPO AND STFR IN LONG-DISTANCE RUNNERS.

Abellan R[1]., Ventura R[1].,Di Giovannandrea R[2].,.Pellegrini M[2].,Marchei E[2]., Pichini S[2], Pascual J.A[1]., Pacifici R[2]., Zuccaro P[2]., Segura. J[1].

[1,] Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain
[2] Clinical Biochemistry Dept. Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy;

Measurement of serum erythropoietin (EPO) and soluble transferrin receptor (sTfR) have been proposed as indirect biomarkers for the detection of recombinant human EPO misuse in sport. To investigate if physiological conditions or training event (intensity of training, competition stress) could affect levels of these biomarkers, serum EPO and sTfR were measured in non-competitive athletes in pre and post-race conditions young non-competitive athletes , and in non-athletic population free from rhEPO consumption.
Serum levels of EPO and sTfR were measured by using a chemiluminescent immunoassay by Immulite DPC and a nephelometric immunoassay by Dade Behring, respectively..
Serum levels of EPO in young non-competitive athletes and in non-athletic population were measured. No differences were found between these two groups (11.1±4.0 and 10.2±3.6 IU/L EPO, respectively), or time extractions (10.7±3.8 and 11.2±4.5 IU/L EPO). Moreover, in young non-competitive athletes, no differences were found between sexes (9.4±2.2 and 12.7±4.7 IU/L EPO, for males and females respectively).
Comparison of pre and post-race levels of EPO showed contradictory results: while an increase of EPO was observed post-race samples in 10 km runners (8.0±3.1 vs. 9.8±4.2 IU/L), a significant decrease of serum EPO was observed in 20 km runners (14.0±4.4 vs. 11.3±3.8 IU/L).
For serum levels of sTfR, no differences were found between young non-competitive athletes and non-athletic population (1.3±0.3 and 1.5±0.3 mg/L sTfR, respectively. Besides, in non-competitive athletes, no differences were found between sexes (1.5±0.2 and 1.4±0.3 mg/L sTfR, for males and females respectively).Comparison of pre and post-race levels of serum sTfR in non-competitive athletes showed an increase (1.4±0.2 vs. 1.5±0.3 mg/L in 10 km runners, and 1.5±0.3 vs. 1.6±0.3 mg/L in 20 km runners). However, this increase was only significant in the 20 km race group.

R. Abellan et al. Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. J. Pharm. Biomed. Anal. (In press)

218

EMILINE: POSSIBILE RUOLO IN PATOLOGIE CARDIOCIRCOLATORIE

Bot S., Doliana R., Colombatti A., Tartaglia S., Clementi M.

C.R.O , Aviano(PN), Dip. Pediatria, Università di Padova

EMILINA è una proteina delle fibre elastiche prevalentemente localizzata tra l'elastina amorfa e le microfibrille, con possibili ruoli nell'elastogenesi e nell'adesione cellulare. Durante lo sviluppo dei vasi sanguigni e del cuore, la deposizione di EMILINA precede l'apparizione di Elastina, la cui deposizione in vitro è alterata dalla presenza di anticorpi anti-EMILINA. Recenti studi hanno individuato proteine simili ad EMILINA (EMILINA-1): EMILINA-2 e Multimerina2. Tutti i membri appartenenti alla famiglia sono caratterizzati da una struttura multimodulare conservata, data da un dominio ricco in cisteine all' N-terminale(EMI domain) e da un dominio globulare di tipo C1q al C-terminale, responsabile di conferire alla proteina funzioni adesive per le cellule.
Studi di espressione indicano che le EMILINE presentano una distribuzione specifica ma tutte e tre presentano espressione significativa a livello del muscolo cardiaco fetale, suggerendo uno specifico ruolo dellle EMILINE nello sviluppo di questo organo; ciò viene rafforzato da risultati preliminari ottenuti con modelli di topi KO per EMILINA-1 evidenzianti difetti nella parete elastica dei grossi vasi in assenza del prodotto genico.Da un punto di vista strutturale sono stati effettuati numerosi studi per comprendere l'assemblaggio evidenziando l'interazione di EMILINA-1 con EMILINA-2. Al momento non sono note malattie ereditarie in cui siano implicati i geni delle EMILINE.
In questo lavoro, abbiamo svolto un'analisi sul DNA di pazienti con difetti cardiovascolari di tipo marfanoide ad origine sconosciuta, alla ricerca di possibili mutazioni in EMILINA-1 o EMILINA-2 che possano essere alla base delle patologie suddette. Usando PCR e analisi SSC, è stata identificata in un giovane paziente con difetti importanti all'apparato cardiocircolatorio una mutazione in omozigosi da una prolina a una serina nel dominio C1q-2. L'analisi biochimica di un dominio C1q-1 ricombinante mutato in corrispondenza del residuo in questione, ha evidenziato che, rispetto al non mutato esso presenta solubilità inferiore e che la forma trimerica nativa del dominio mutato dissocia a temperature sensibilmente inferiori. Inoltre saggi di adesione cellulare mostrano come il dominio mutato leghi alle cellule meno efficientemente rispetto al non mutato. In parallelo sono stati effettuati screening in PCR di donatori per individuare la frequenza della mutazione in esame nella popolazione (risultata essere l'8%). Ulteriori esperimenti tenderanno a chiarire il possibile effetto di questa mutazione nella struttura e funzione del dominio C1q delle EMILINE, e il possibile legame alla patologia osservata.
Bibliografia:
-Colombatti A.et al. (2000). Matrix Biology19:289-301.
-Zanetti M. et al. (2004) Mol Cell Biol.24(2):638-50.

219

BIOLOGICAL VARIATION OF PROCALCITONIN IN HEALTHY INDIVIDUALS

Barassi[1] A.; Pallotti[1] F.; Massari[2] G.; Nauti[2] A.; Melzi d'Eril[1] GV.

[1]DECBS, Univ. of Insubria, Varese. [2]Hospital of Circolo, Varese.

INTRODUCTION. High serum concentrations of procalcitonin (PTC), a stable 116-amminoacid precursor molecule to the proteohormone calcitonin, have been reported in patients with severe systemic bacterial or fungal, but not viral, infections and in patients with nonseptic inflammatory diseases and metastatic cancers. The aim of this study was to evaluated the biological variation of PCT. METHODS. Five blood specimens were collected from 16 apparently healthy laboratory workers (5M/11W, age-range 43-62y) twice a week (Tuesdays and Fridays) over a 17-day period. None of the workers smoked, took any medication, or consumed substantial quantities of alcohol. After an overnight fast, a blood specimen was taken by conventional venipuncture between 0800 and 0900 with the volunteers in the sitting position, avoiding venous stasis. All samples were drawn by the same phlebotomist, and then centrifuged at 3000g for 15 min at room temperature within 1 h of collection. Sera were separated and stored at -80°C until analysis. At the end of the collection period, all samples were thawed, mixed, and centrifuged for analysis in a single run in duplicate. PCT concentrations were determined by TRACE (time resolved amplified cryptate emission) methodology (Brahms). The assay was performed on Kryptor (Brahms). RESULTS. The analytical (CV_A) and intra- (CV_I) and interindividual (CV_G) components of variation were calculated by nested ANOVA. We also calculated the critical difference (CD) for significant changes in serial results ($p<0.05$), the index of individuality (II), and the desirable quality specifications for imprecision (I), bias (B), and total error (TE), which were calculated using the formulas: $I<0.5CV_I$; $B<0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$; and $TE< 1.65I + B$ ($\alpha<0.05$).

	GROUP	
	all	
MEAN (ng/mL)	0.04	
CV_A (%)	14.85	
CV_I (%)	16.05	
CV_G (%)	22.28	
II	0.72	
CD (%)	60.57	
I (%)	8.03	**Desirable quality specifications**
B (%)	6.86	
TE (%)	**20.11**	

CONCLUSIONS. The low index of individuality shows that the use of population-based reference limits is inadequate for interpretation. TRACE precision assay does not meet the goal based on biological variation at least at the concentrations measured in the reference range. REFERENCE. Fraser CG. Washington AACC Press 2001: 151pp.

220

INDAGINE NAZIONALE SULL'IMPIEGO DELLA DETERMINAZIONE DELLA COLINESTERASI SIERICA (CHE)

Mosca A.[1], Ceriotti F.[2], Franzini C.[3], Panteghini M.[4] per il Gruppo di Studio 'Enzimi' SIBioC

[1]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Segrate MI; [2]Laboratorio Standardizzazione, Istituto Scientifico H. San Raffaele, Milano; [3]Istituto di Scienze Biomediche, Ospedale L. Sacco, Università degli Studi, Milano; [4]Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, A. O. "Spedali Civili", Brescia

Introduzione. Il Gruppo di Studio 'Enzimi' SIBioC ha recentemente dimostrato che il metodo che utilizza la succinilditiocolina come substrato è il più adatto, tra quelli abitualmente disponibili per la determinazione della CHE, all'identificazione dei soggetti sensibili al miorilassante suxametonio impiegato in anestesia, sulla base della determinazione della sola attività enzimatica nel siero. Al fine di poter eventualmente proporre tale metodo come base per una procedura di riferimento sulla base della quale standardizzare la determinazione della CHE, è stata effettuata un'indagine conoscitiva sullo stato attuale dell'impiego di tale determinazione.
Metodi. Questionario distribuito attraverso il sito web SIBioC e la rivista Biochimica Clinica.
Risultati. Hanno risposto 112 laboratori. Il 14 % di essi effettua più di 1000 determinazioni/mese di CHE, il 32% tra 200 e 1000, il 19% tra 50 e 200 ed il 33% meno di 50 test al mese. Riguardo alla motivazione della richiesta, nel 45% dei casi la CHE è misurata per valutare l'eventuale sensibilità all'anestetico suxametonio (screening preanestesia), nel 28% come indice di funzionalità epatica, nel 15% dei casi per entrambi questi motivi e, solo in una minoranza (5) di laboratori, anche come indice di possibile esposizione a pesticidi organofosforici. Il 7% dei laboratori non ha saputo fornire informazioni riguardo all'utilizzo clinico del test. Per quanto riguarda la scelta del metodo, la butirriltiocolina è il subtrato più utilizzato (89%), mentre la benzoilcolina (3%) od altri substrati (succiniltiocolina, acetiltiocolina – 1%) sono utilizzati solo in una minoranza di casi. Nonostante l'elevata omogeneità metodologica, è stata riscontrata una grande variabilità negli intervalli di riferimento impiegati, che risultano essere differenti non solo per utilizzatori di diverse metodiche, ma anche all'interno del gruppo di utilizzatori dello stesso metodo. Alcuni partecipanti utilizzano intervalli di riferimento separati per sesso (29%), età (12%) e gravidanza (13%). Il 49% dei laboratori misura anche il numero di dibucaina per la stima della sensibilità al suxametonio. Solo un laboratorio misura il numero di fluoruro.
Conclusioni. La presente indagine dimostra che, nonostante la dimostrata superiorità diagnostica, il metodo succinilditiocolina non è in pratica utilizzato.
Bibliografia. Mosca A, Bonora, R, Ceriotti F et al. Assay using succinyldithiocholine as substrate: the method of choice for the measurement of cholinesterase catalytic activity in serum to diagnose succinyldicholine sensitivity. Clin Chem Lab Med 2003; 41:317-23.

221

GLI ANTIOSSIDANTI IN PATOLOGIE CORRELATE ALL'INVECCHIAMENTO

Metelli M.R., Pifferi S., Puccetti C., Manzone F., Fulceri F., °Pazzaglia M., Pietrini P., Panicucci E.

U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate, °U.O. Medicina Generale 2°, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana.

Lo stress ossidativo è la conseguenza di livelli elevati nell'organismo di specie reattive dell'ossigeno, denominati radicali liberi, che i nostri sistemi antiossidanti non riescono a neutralizzare. Conseguenza di ciò, con il passare degli anni, in molti tessuti si assiste ad un definitivo accumulo di molecole difettose, di aberrazioni cromosomiche e di residui cellulari. Queste modificazioni strutturali portano alla formazione di siti di alterata funzionalità progressiva. Scopo del presente studio è stato determinare i principali indici di metabolismo ossidativo quali Glutatione perossidasi (GPX), Glutatione riduttasi (GR), Superossido dismutasi (SOD) e Antiossidanti totali (AoT) in pazienti anziani affetti da patologie internistiche in confronto a soggetti sani di controllo equiparabili per età e sesso. Lo studio è stato condotto in 37 pazienti (15 maschi e 22 femmine) di età compresa tra 58 e 94 anni (77 ± 9, media ± SD). Tutti i pazienti studiati erano soggetti anziani afferenti al reparto di medicina generale. Come gruppo di controllo sono stati utilizzati 21 soggetti sani, (11 maschi e 10 femmine) di età compresa tra 56 e 88 anni (75 ± 9, media ± SD, p = n.s.). Il dosaggio delle molecole antiossidanti è stato effettuato con metodo enzimatico e colorimetrico. Per la GR e la SOD i dati ottenuti nei pazienti in studio hanno presentato valori statisticamente più elevati rispetto al gruppo di controllo (test t per varianze non omogenee = 4.13, p = 0.0001) e (test t per varianze omogenee = 2.03, p = 0.046) rispettivamente. Per la GPX e l' AoT non è stato riscontrato alcuna differenza tra i controlli ed i pazienti. I risultati ottenuti indicano un' alterazione del metabolismo ossidativo in pazienti affetti da patologie correlate all' età rispetto a soggetti sani e sono in accordo con i dati della letteratura che chiamano in causa un' alterazione del metabolismo ossidativo nell' invecchiamento patologico.

222

PRODUZIONE DI CITOKINE INFIAMMATORIE DURANTE TRATTAMENTO EMODIALITICO: STUDIO CON METODICA ELISPOT

Bondanini F., *Palumbo R., Fumagalli E., *Galliani M., Marinucci S., *Calabria S., *Paone A., Fusco A.

U.O. Biochimica Clinica, *U.O. Nefrologia Dialisi e Litotrissia - Ospedale "S. Pertini", ASL Roma B, Roma

Numerosi studi hanno evidenziato nei soggetti affetti da insufficienza renale cronica in trattamento emodialitico una stretta relazione tra stato infiammatorio, accelerazione della progressione delle lesioni aterosclerotiche e aumento della morbilità e mortalità cardiovascolare (§). Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare con metodica Elispot la secrezione di 4 citokine infiammatorie (IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ) da parte di linfociti periferici di soggetti in emodialisi cronica prelevati prima e dopo il trattamento sostitutivo.
Sono stati selezionati 20 soggetti in trattamento emodialitico cronico da almeno 12 mesi (15 M, 5 F, età media 62±6 aa). 20 cc di sangue venivano prelevati dalla fistola arterovenosa con sistema Vacutainer in provette con EDTA e centrifugati in gradiente Fycoll per 30 min. a +18°C. I linfociti venivano quindi lavati 2 volte in PBS e 1 volta in terreno RPMI sterile contenente 10% di FCS inattivato al calore e 1% di glutamina; quindi, il sovranatante veniva scartato e il pellet cellulare veniva risospeso in 3 ml di terreno di coltura. I linfociti venivano quindi contati al microscopio in camera di Burker, diluiti fino ad ottenere, per ciascun campione, una concentrazione di $3x10^6$/ml, e seminati su 4 diversi tipi di piastre Elispot (Amplimedical, Torino), uno per citokina considerata, in doppio in due serie, senza e con fitoemagglutinina come sostanza stimolante. Le piastre venivano incubate per 24 ore in incubatore a 5% di CO_2, e quindi trattate secondo un classico procedimento di dosaggio immunoenzimatico. Al termine, le piastre venivano lette dall'ELISpot Reader (Amplimedical). Ogni spot corrisponde a un singolo linfocita adeso al fondo del pozzetto che ha secreto la citokina, rivelata poi dalla reazione immunoenzimatica. I risultati del nostro studio indicano che le 4 citokine considerate vengono secrete in quantità più elevate (maggior numero di spot) dai linfociti prelevati al termine del trattamento emodialitico, sia in condizioni basali, sia in seguito a stimolo con PHA. In conclusione è possibile affermare che il trattamento emodialitico, per il determinarsi di fenomeni immuno-allergici indotti dal contatto tra i linfociti circolanti e la membrana del filtro di dialisi, costituirebbe uno stimolo capace di evocare, nel soggetto uremico, una risposta infiammatoria, responsabile dei numerosi effetti avversi clinicamente rilevanti, sia acuti (febbre, disturbi del sonno, ipotensione), che cronici (anemia, osteodistrofia, malnutrizione, progressione della placca aterosclerotica).
§ Galle J, Seibold S, Wanner C. Inflammation in uremic patients: what is the link? Kidney Blood Press Res. 2003;26(2):65-75

223

TIPIZZAZIONE IN IMMUNOFISSAZIONE DELLE COMPONENTI MONOCLONALI. INDISPENSABILE?

Leoni A., Martinelli C., Botta N., Chelli M., Simonini N., La Gioia A.

Laboratorio di Patologia Clinica ASL 6 Livorno

La presenza di una componente monoclonale (CM) rappresenta un riscontro occasionale di laboratorio sempre più frequente
Una rilevante percentuale delle CM costituisce un epifenomeno di patologie note quali malattie infettive, o autoimmuni o neoplastiche (gammapatie di accompagnamento) ovvero non è correlabile con alcuna evenienza patologica nota (gammapatia monoclonale di incerto significato, MGUS).
Le caratteristiche molecolari delle CM o, entro certi limiti, i soli dati quantitativi ed altre indagini di laboratorio non sono in genere sufficienti a definire la natura "benigna" (gammapatia di accompagnamento, MGUS) o "maligna" (malattia linfoproliferativa B) di una CM. Tali caratteristiche sono quindi affermate dal solo criterio clinico di "progressività", intesa sia come incremento nel tempo della CM sia come comparsa di segni d'organo (anemia, insufficienza renale, interessamento osseo).
Numerosi laboratori accompagnano l'evidenza di anomalie del tracciato elettroforetico suggestive o conclusive per presenza di CM con il consiglio di eseguire una immunofissazione (IF); altri la eseguono routinariamente come "reflex test".
Questi comportamenti hanno determinato un vertiginoso incremento delle IF eseguite, non sorretto dalla evidenza che la tipizzazione di CM anche minime, di accompagnamento o MGUS, sia utile per un miglior governo clinico.
Sulla base di queste valutazioni e con lo scopo di migliorare l'appropriatezza in questo ambito diagnostico, contenendo nel contempo l'utilizzo delle risorse, nel nostro laboratorio, da alcuni mesi, abbiamo abbandonato il precedente atteggiamento prescrittivo ("….probabile presenza di CM; si consiglia IF") ed utilizziamo per la refertazione delle CM, i seguenti commenti al tracciato elettroforetico.
CM1: Probabile presenza di CM di modesta entità. Si consiglia rivalutazione periodica del tracciato elettroforetico (ogni 6 mesi)
CM2: Presenza di CM di modesta entità .Si consiglia rivalutazione periodica del tracciato elettroforetico (ogni 6 mesi)
CM3: Presenza di CM quantificabile. Si consiglia rivalutazione periodica del tracciato elettroforetico e monitoraggio biochimico ed ematologico (ogni 6 mesi). In quest'ultimo caso la CM viene quantificata e ne viene espresso il dosaggio in valore assoluto (g/dL)
Conclusioni: i dati ancora parziali dimostrano tendenza alla significativa riduzione delle IF eseguite su CM minime.

224

SUBCELLULAR PROTEOMICS OF RENAL CELL CARCINOMA

*Raimondo F., *Ceppi P., *Di Fonzo A., *Magni F., *Valsecchi C., †Cordani N., †Ferrero S., †Bosari S., *Sarto C., #Favini P., #Casellato S., #Musi G., *Pitto M., *Mocarelli P.

*Dept of Exp., Env. Medicine & Biotechnology, Univ. of Milano-Bicocca. † Dept of Medicine, Surgery and Dental Sciences, Pathology Unit, Univ. of Milan.
Urological Clinic I, Univ. of Milan, Italy.

Caveolae are flask-shaped invaginations of plasma membrane, involved in fundamental cellular events, such as signal transduction and cell adhesion. Caveolae and their structural coat protein caveolin seem to be implicated in human diseases, including cancer. In fact, recent studies suggest a role for caveolae and their components in neoplastic transformation. Inside a more general project, aimed to define the proteome of renal cell carcinoma (RCC), we intend to characterise the subcellular proteome of RCC caveolae, in order to set up new markers for this neoplasm (1). To this purpose, plasma-membrane-enriched fractions were prepared from 10 surgical samples of RCC and adiacent normal kidney (ANK), following nephrectomy. After treatment with Triton X-100, in which caveolar structures are insoluble, and floatation in a discontinous sucrose density gradient, ten fraction were collected from the top of the gradients. Fractions #5, displaying the highest caveolin enrichment, were concentrated by ultracentrifugation and analyzed by two dimensional electrophoresis, performed on mini-gels and using optimised experimental conditions for hydrophobic proteins. 2DE of caveolar fractions from RCC display characteristic patterns, although contamination of some cytosolic proteins is still present. Typical caveolar proteins were detected by immunoblotting and the corresponding spots were identified by MALDI-TOF. In particular, identification of caveolin-1 and flotillin-1, known markers of caveolar microdomains, was confirmed. Preliminary results of comparison between RCC and ANK show higher amount of caveolin and flotillin in samples from tumoral tissue. This result is in agreement with our previous studies on plasma membrane-enriched fractions from RCC and ANK, showing an up-regulation of caveolin expression in tumoral samples. Characterization of other differentially expressed spots is in progress. In conclusion, we optimized a micro-scaled protocol for proteomic analysis able to identify hydrophobic proteins and applied it to proteome study of RCC caveolae. This approach looks promising in view of identifying possible differentially expressed proteins involved in neoplastic transformation and to provide candidate tumor markers.

1) Sprenger R.R., et al., Electrophoresis (2004), 25, 156-172.

225

EFFECT OF CIGARETTE SMOKE EXTRACT ON NEUTROPHIL GLUTATHIONE CONCENTRATION AND ITS RELATED ENZYMES

Persichilli S[§]., Minucci A[§]., Scribano D. [§], Fasanella S.[@], Giardina B. [§], Zappacosta B.*

§ Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica e [@]Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica del Sacro Cuore Roma
*Centro di Ricerche ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Tobacco smoke is a well recognized risk factor for several diseases, ranging from inflammatory to neoplastic diseases. A lot of noxious compounds originate from cigarette smoke ranging from particulate materials to water solutes and gaseous extracts.
Two groups of substances have been deeply studied in order to better understand some aspects of tobacco smoke toxicity: reactive oxygen species and aldehydes.
Aldehydes, in particular α,β-unsaturated (acrolein and crotonaldehyde), easily react with sulphydril groups of both small molecules and proteins. A consequence of this interaction is the functional inactivation of different enzymes by inactivation cysteine residues. In this study the effect of cigarette smoke extract (CSE) on glutathione (GSH) concentration of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) has been evaluated. Furthermore the GSH related enzyme activities [(Glugose-6-phosphatedehydrogenase (G6PDH), glutathione reductase (GR) and Glutathione peroxidase (GPx)] have been studied.
Methods: PMN isolation is achieved by a modification of the method of Boyum
CSE is prepared by bubbling smoke from one cigarette for 4-5 min. through KRP solution by the continuous aspiration of a water vacuum pump
GSH was measured by HPLC according to the method of Araki and Sako with slight modifications.
G6PDH, GR and GPx were measured by using commercially available kits from Randox and Sigma on an automatic clinical analyzer (Olympus AU400).
Results: exposure of PMNs to CSE resulted in a significant depletion of cellular GSH (from 15.4 nmoles/10^7 PMN to 1.8 nmoles/10^7 PMN). Likewise all the enzymes lost 50% of their activities after 30' exposure to CSE
Discussion: our results show that α,β-unsaturated aldehydes present in CSE strongly impaired the function of PMN both by depleting the free GSH level and by inactivating the key enzymes in maintaining adequate thiol redox status. The mechanism of this inactivation is confirmed by the decrease of total protein SH concentration (unshown data).

Nguyen H., et al. Toxicology 2001; 160: 207-217

226

CONFRONTO TRA SISTEMI ANALITICI PER LA RICERCA E LA CARATTERIZZAZIONE DELLE COMPONENTI MONOCLONALI NEL SIERO

Pateri F., Longhi E., Barberis M., Dolci A.

Dipartimento di Patologia MultiMedica, Milano

Razionale: la rilevazione di una componente monoclonale (CM) nel siero rappresenta uno dei più importanti segni che la patologia clinica possa cogliere, sia per il ruolo esclusivo del laboratorio nella rilevazione di una proteina monoclonale per mezzo dell'elettroforesi (EF) e delle tecniche immunoelettroforetiche (tIEF), che per l'elevato impatto clinico che tale diagnosi riveste per il paziente.
Scopo del lavoro: valutare e confrontare la praticabilità analitica e l'efficacia diagnostica di due sistemi analitici per l'esecuzione di EF e tIEF.
Metodologia: su 2331 sieri inviati in laboratorio abbiamo eseguito la ricerca di CM in elettroforesi capillare (CZE) sia sul sistema analitico che comprende un'analizzatore per CZE ed uno per immunofissazione delle sieroproteine (IFE) su gel di agarosio (Capillarys + Hydrasys, Sebia Italia, Firenze; CHY) che sul sistema analitico che utilizza un unico analizzatore (Paragon CZE 2000, Beckman Coulter, Milano; PAR) per la CZE e l'immunosottrazione (ISE). Per lo studio è stato applicato il protocollo standard in uso in laboratorio ovvero ricerca della CM in CZE come screening ed esecuzione della tIEF per la conferma e la caratterizzazione della CM rilevate. Il confronto tra le tIEF, IFE ed ISE, è stato svolto su 80 sieri con CM evidenziata allo screening in CZE.
Risultati: su 2331 sieri analizzati, abbiamo rilevato in CZE una CM sospetta o evidente in 334 casi (14.3%) su CHY ed in 331 (14.1%) su PAR; 329/334 (98.5%) CM sono state rilevate da entrambi i sistemi diagnostici; i 5 casi discordanti si riferiscono a 3 falsi positivi di CHY ed a 2 falsi negativi, cioè 2 CM non rilevate in CZE ma evidenziate all'IFE, 1 su CHY, in zona β$_1$ (all'IFE IgA lambda), ed 1 su PAR in zona gamma (all'IFE IgMk). La concordanza totale dei due sistemi in CZE è del 99,7%. (2326/2331). Delle CM analizzate con tIEF, 73/80 (91,2%) sono confermate e caratterizzate allo stesso modo in IFE ed in ISE, mentre 7 casi sono discordanti e risultano tutti falsi negativi dell'ISE. Delle 7 CM non rilevabili all'ISE, 6 hanno una concentrazione <1g/L, ed 1 è una CM IgM k di notevole entità a migrazione catodica, non rilevata su PAR anche in CZE. In termini di praticabilità abbiamo valutato la cadenza analitica della CZE, risultata di 60 tests/ora su CHY contro i 40 tests/ora di PAR, mentre per le tIEF l'ISE, eseguita in completa automazione su tubo primario, richiede 2 ore per un batch da 10 campioni; l'IFE in semiautomazione richiede circa 1 ora per un gel da 4 sieri.
Conclusioni: i sistemi di CZE valutati mostrano una praticabilità analitica ed una efficacia diagnostica simile; emerge invece una minor sensibilità analitica dell'ISE rispetto all'IFE con conseguente rischio di non rilevare alcune CM di concentrazione <1g/L.

227

IDENTIFICAZIONE E TIPIZZAZIONE DELLA PROTEINA DI BENCE JONES IN ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE (CZE)

Ponchia S., Mussap M., Zaninotto M., Varagnolo M., Plebani M.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale di Padova

Scopo di questo lavoro è la valutazione di un nuovo metodo separativo in elettroforesi capillare zonale (CZE) per l'identificazione della proteina di Bence Jones (BJ), mediante l'utilizzo dello strumento Paragon CZE™ 2000 (Beckman Coulter, Milano, Italia). Il software gestionale del Paragon CZE è stato preventivamente modificato dal Produttore per eseguire l'analisi delle proteine urinarie. Queste modifiche hanno aumentato la sensibilità del segnale, permettendo di identificare le principali proteine urinarie come frazioni elettroforetiche distinte e di visualizzare come picco monoclonale la presenza di BJ anche in basse concentrazioni. Inoltre il picco monoclonale può essere tipizzato mediante successiva immunosottrazione. Lo studio è stato condotto su 90 campioni di urina delle 24 ore trattate con conservante, e con concentrazione proteica compresa tra 0,03 e 0,50 g/L. Tutti i campioni hanno subito un trattamento pre-analitico, che consiste in una separazione cromatografica (colonnine Pharmacia Sephadex G-25 Nap-5) delle proteine al fine di ridurre il rumore di fondo nei tracciati elettroforetici e di evitare la comparsa di picchi riferibili a molecole non proteiche che possono interferire nell'interpretazione dei grafici. Inoltre i campioni sono stati contemporaneamente analizzati con il test di immunofissazione su gel d'agarosio (IFE, Dako Ltd, Milano, Italia), considerato metodo di riferimento. La presenza della proteina di BJ è evidenziata all'elettroferogramma come un picco monoclonale facilmente confrontabile con quello ottenuto con l'IFE. Dopo ever effettuato prove sperimentali nel seguente modo, è stato ottimizzato il protocollo per la fase pre-analitica: 0,5 mL di campione nativo vengono introdotti nella colonnina cromatografica, aggiungendo 0,2 mL di reagente Signal (Beckman Coulter, Milano, Italia); la frazione che eluisce viene scartata. Successivamente, l'aggiunta di 0,7 mL di Signal permette l'eluizione della frazione adibita poi all'analisi. La sensibilità analitica del metodo, riferita alla minima concentrazione di proteine totali che permette di identificare un picco monoclonale sul tracciato elettroforetico, è di 0,05 g/L. Nella nostra casistica tutti i campioni positivi alla proteina di BJ e tipizzati dall'IFE sono stati confermati con CZE, inclusi quelli che presentavano un contenuto di proteine totali di 0,10 g/L. Non sono stati riscontrati inoltre risultati falsi negativi. Nel nostro studio la CZE ha permesso di ottenere un alto potere risolutivo dei tracciati; inoltre, rispetto al metodo di riferimento, presenta un'elevata rapidità e ridotti costi di analisi, nonché l'uso di una ridotta quantità di campione. La CZE può quindi essere considerata un'utile metodica automatizzata per la determinazione della proteina di BJ su campioni di urina.

228

FATTORI DI IMPRECISIONE NELLA MISURA DELLE COMPONENTI MONOCLONALI DEL SIERO CON ELETTROFORESI CAPILLARE.

Luraschi P., Infusino I., Merlotti C., Franzini C.

Laboratorio di Analisi, Ospedale L. Sacco, Milano, Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica e Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Università degli Studi di Milano, Milano.

La ricerca delle componenti monoclonali (CM) è uno degli scopi principali dell'elettroforesi delle proteine del siero. L'elettroforesi capillare si è dimostrata essere adatta oltre che a tale ricerca anche alla misura delle CM. La precisione di tale misura è importante per valutare le variazioni nel tempo delle CM in quanto criterio indicativo di evoluzione maligna della malattia. Il posizionamento (manuale) dei limiti di integrazione può costituire una possibile fonte di variabilità della misura (Luraschi et al. Biochim Clin 2003;27:158 [Abstract]). Per meglio valutare tale elemento di variabilità abbiamo selezionato 15 campioni con CM di differente entità di cui 4 "piccole" (valori medi di CM da 3,4 a 4,8 %Prot), 6 "medie" (valori medi di CM da 8,6 a 16,4 %Prot) e 5 "grandi" (valori medi di CM da 23,0 a 36,7 %Prot). Per ogni campione sono state allestite 10 aliquote conservate a -20 °C fino al momento dell'analisi su sistema Paragon CZE (Beckman); quindi per ogni tracciato elettroforetico ottenuto, 4 operatori, in maniera indipendente, hanno provveduto a posizionare i limiti di integrazione per la stima del valore della CM espressa come percentuale dell'area totale (in unità "%Prot"). I valori di variabilità globale della misura, espressi come CV %, da 4x15=60 stime per ciascun campione, venivano riportati contro le concentrazioni delle CM presenti per ottenere il profilo di imprecisione. Quest'ultimo veniva confrontato con l'analogo profilo di imprecisione ottenuto come precedentemente descritto (Luraschi et al. Biochim Clin 2003;27:158 [Abstract]), e rappresentativo della variabilità dovuta al solo posizionamento dei limiti di integrazione. Interpolando tali profili a valori di concentrazione della CM pari a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 %Prot, si ottenevano i valori di imprecisione (CV %) che seguono. Solo posizionamento dei limiti: 10,0; 4,8; 3,0; 2,0; 1,5; procedimento globale: 23,0; 5,5; 6,0; 4,0; 2,5. Questi dati mostrano una discreta variabilità del procedimento globale, decrescente con l'aumentare della concentrazione della CM; il posizionamento dei limiti condiziona di per sé la metà circa di tale variabilità. Esaminando i valori successivi ottenuti in pazienti nell'arco di 10-53 mesi, è stato possibile osservare che nel caso di "piccole" CM stabili i valori si mantenevano entro l'intervallo corrispondente al valore iniziale ± 2DS ricavate dal summenzionato profilo di imprecisione globale; nel caso di CM "grandi", associate a malattia linfoproliferativa maligna, sottoposta a cicli di terapia, i valori riscontrati uscivano dal medesimo intervallo.

229

DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA DI BENCE JONES IN ELETTROFORESI CAPILLARE: VALUTAZIONE PRELIMINARE

Graziani MS, DallaDea E[1], Righetti G, Marini M, Patuzzo R, Anselmi G.

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM Azienda Ospedaliera di Verona; [1]Beckman Coulter SpA, Milano

Scopo valutare la possibilità di determinare la proteina di Bence Jones (PBJ) in elettroforesi capillare.
Materiali e Metodi Strumento: Paragon CZE 2000®, versione 2.0 (Beckman Coulter); Procedura: prima di essere posti sullo strumento i campioni vengono sottoposti a desalificazione su colonna; Campioni: urine fresche da pazienti con gammapatia monoclonale sierica; Metodo di Confronto elettroforesi e immunofissazione su agarosio (Hydrasis Sebia)
Risultati Sensibilità: 10 campioni positivi per PBJ sono stati diluiti fino a 5 mg/L; il picco relativo alla PBJ era visibile a concentrazioni di proteina variabili tra 5 e 20 mg/L. Confronto: 50 campioni successivi pervenuti con richiesta di PBJ sono stati eseguiti con Paragon CZE 2000® ed in agarosio; l'ispezione visiva dei tracciati mostrava un pattern elettroforetico concordante (proteinuria fisiologica, glomerulare, tubulare, da overflow) con i due metodi in tutti i casi. In alcuni campioni in elettroforesi capillare erano visibili picchi aggiuntivi di non facile interpretazione. In altri casi si è notata una discordanza nelle concentrazioni relative delle diverse proteine. Riproducibilità: 3 diversi campioni sono stati posti nelle sette posizioni di tre settori consecutivi (21 repliche); il CV delle singole frazioni variava da 1.7 a 10.2%.
Discussione e Conclusioni: lo strumento Paragon CZE 2000®, è in uso da alcuni anni per l'esecuzione delle elettroforesi sieriche, ma il software installato non consentiva l'analisi di campioni con basso contenuto proteico. La ricerca della PBJ è una parte essenziale della valutazione dei pazienti con componente monoclonale sierica ed i metodi utilizzati devono soddisfare precisi requisiti (1).
Dalla esperienza fatta finora si può concludere che il metodo è sufficientemente sensibile per essere utilizzato nei pazienti con gammapatia monoclonale ed è in buon accordo con il metodo raccomandato per questo scopo (elettroforesi e immunofissazione in agarosio) (1). Tuttavia alcune aree grigie meritano ulteriori approfondimenti. Tra queste segnaliamo: una sensibilità non soddisfacente in tutti i campioni e la comparsa di picchi non precisamente identificabili. Resta infine da investigare più a fondo l'utilizzo della immunosottrazione per la tipizzazione di PBJ.

1. Graziani MS, Merlini G, Petrini C Guidelines for the analysis of Bence Jones Protein. Clin Chem Lab Med 2003;41:338-346

230

CONFRONTO FRA DUE METODI PER LA QUANTIZZAZIONE DELLA PROTEINA DI BENCE JONES

Balboni F., Caldini A*, Malesci P*., Terreni A*., Sbolci V*., Morrocchi B, Salati A, Giove C e Messeri G*.

Laboratorio Analisi IFCA, Firenze
* Laboratorio Analisi Biochimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze

La determinazione ed il dosaggio della BJ trova utilità clinica alla diagnosi e nel follow-up dei pazienti affetti da patologie neoplastiche delle linfociti B. La determinazione della BJ deve essere effettuata mediante immunofissazione urinaria, metodica che evidenzia la presenza delle due caratteristiche fondamentali della BJ cioè il fatto che sia costituita da catene leggere libere e monoclonali. La sua quantizzazione invece può essere effettuata mediante dosaggio immunometrico in nefelometria/turbidimetria o tramite calcolo densitometrico della banda BJ, ognuna delle quali non è esente da critiche. Difatti i metodi immunologici, utilizzando antisieri diretti contro le catene leggere policlonali, possono non reagire nello stesso modo contro le catene leggere monoclonali.. Per di più la metodica non è in grado di distinguere fra catene leggere libere monoclonali e policlonali. D'altro canto il dosaggio densitometrico del picco corrispondente alla BJ nel tracciato elettroforetico delle urine, risente della diversa affinità delle catene leggere libere monoclonali per i coloranti usati, inoltre la quantizzazione della banda BJ può essere resa difficoltosa dalla migrazione coincidente di altre proteine.
Sono stati analizzati 53 campioni di urine delle 24 ore mediante immunofissazione utilizzando il sistema per elettroforesi Hydrasis della Ditta Sebia. Sui campioni risultati positivi sono state misurate le proteine totali urinarie con Rosso di Pirrogallolo su AU400. La scansione densitometrica è stata eseguita col programma Phoresis della ditta Sebia. Il dosaggio immunologico delle catene □e□ libere è stato eseguito sul nefelometro BNII (Dade Behring) utilizzando gli antisieri della New Scientific Company. In 15 campioni la BJ era visibile solo all'immunofissazione. I valori ottenuti con entrambi i metodi sui restanti 38 campioni sono stati analizzati mediante correlazione di Pearson (r = .888 (1coda); p=0.01). Malgrado le diverse problematiche connesse ai due tipi di dosaggio, i valori ottenuti sono nella maggior parte dei casi confrontabili tra loro, come dimostrato dalla correlazione di Pearson. Tuttavia in tre dei campioni risultati dosabili, i due metodi hanno fornito risultati molto diversi fra loro, confermando quanto sia importante nel follow-up dei pazienti che il dosaggio della BJ sia eseguito sempre nello stesso laboratorio e con lo stesso metodo.

Graziani M., Merlini G., Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones Protein. Clin Chem Lab Med 2003; 41(3):338-346.

231

COLLAGEN TYPE I CARBOXY-TERMINAL PROPETIDE AND TELOPEPTIDE MEASUREMENT IN PLASMA OF PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION BY RIA AND EIA METHODS

Pallotti F[1], Giudici E[2], Vigetti D[1],Viola M[1], Karousou E[1], De Luca G[1], Grandi A[2], Passi A[1], Melzi D'Eril GV[1].

[1]Department of Experimental Biomedical and Clinical Sciences, and [2]Department of Clinical Medicine, University of Insubria, Varese, ITALY

BACKGROUND: Arterial hypertension is often associated with cardiovascular remodeling, which is characterized by an increased extracellular matrix (ECM) content of collagen type I and III in cardiac tissue(1). The aim of this work is to evaluate carboxy-terminal propeptide of collagen type I (PIP), marker of collagen type I synthesis and carboxy-terminal telopeptide of collagen type I (CITP), marker of collagen type I degradation in plasma of normotensive and hypertensive patient. We used plasma instead of serum considering the possibility to measure in the same sample collagen peptides and the metalloprotease activity, the latter responsible for collagen degradation. **METHODS AND RESULTS**: We measured CITP and PIP in plasma of 20 normotensives (10 male and 10 female, age 50.2 ±14 and 49.5 ±11). Sistolic pressure over 24 h (PAS24) was 119±6 male and 122±6 female, diastolic pressure over 24 h (PAD24) was 75±4 and 74±4, respectively). 69 hypertensive patients (46 male and 23 female, age 46±12 and 47±8) with PAS24 137±9 and 137±8, PAD24 88±6 and 85±8, respectively, were studied. All patients were selected after appropriate clinical and laboratory evaluations to exclude hypertension secondary to other diseases. The plasma PIP and CITP levels were assessed in duplicate using commercial available RIA (Orion Diagnostics, Finland) and EIA (Orion Diagnostics, Finland, and Quidel Corporation, USA) test. The PIP lower detection limit was 5 μg/L and 0.2 μg/L for RIA and EIA test and CITP lower detection limit was 0.7 μg/L and 1 μg/L for RIA and EIA. PIP in normal male was 116.12±8 μg/L (RIA) and 84.91±5 μg/L (EIA), in male hypertensive PIP was higher: 130.15±5 μg/L (RIA), 89.84±4 (EIA). PIP in normotensive female was 116.26±11 μg/L (RIA) and 79.87±9 μg/L (EIA); in hypertensive female PIP was 113.73±8 μg/L (RIA) and 75.77±4 μg/ml (EIA). In normotensive male plasma CITP was 3.63±0.4 μg/L (RIA) and 3.03±0.6 μg/L (EIA) (in female 3.11±0.3 μg/L RIA and 2.77±0.2 μg/L EIA) and in hypertensive male CITP was to 3.98±0.2 μg/L (RIA) and 3.22±0.4 μg/L (EIA) (in female 3.01±0.2 μg/L RIA and 2.47±0.3 μg/L EIA). **CONCLUSIONS** This preliminary work was performed to characterize the collagen type I metabolism through determination of its plasma peptides in a population of non treated hypertensive patients selected for a long term study with antihypertensive drugs. Our data did not show a strict correlation among the parameters studied. The comparison between RIA and EIA kits designed, for serum determination of collagen type I peptides, showed a substantial equivalence in terms of sensitivity and reproducibility. **Bibliography** 1- Querejeta R. et al. (2000) Circulation; 101: 1729-1735

232

MISURA DELLA LIPASI CON METODO CON SUBSTRATO CROMOGENICO: DEFINIZIONE DEI VALORI DI RIFERIMENTO

Cattozzo G.[1]; Monteggia M.[1]; Melzi d'Eril G.[1, 2]

[1]A.O. Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese
[2]DSBSC, Università dell'Insubria, Varese

La misura della concentrazione di attività catalitica della lipasi (EC 3.1.1.3) è largamente utilizzata per la diagnosi di pancretite acuta. Nella pratica clinica i valori misurati per i pazienti vengono confrontati con i valori osservati, con il medesimo metodo, in una popolazione (di riferimento) costituita da soggetti esenti da malattie che possano determinare alterazioni del componente misurato. In questo lavoro si sono definiti i valori di riferimento per la misura della lipasi con un metodo basato sull'idrolisi di un estere della metilresorufina, liberato dal triacilglicerolo ad opera della lipasi. Si sono analizzati 237 campioni di siero prelevati da individui sani (116 maschi e 121 femmine) di età compresa fra 3 e 81 anni (media 40,6; deviazione standard 15,3; mediana 39,0): 145 di questi soggetti erano pazienti ambulatoriali del nostro laboratorio, i restanti 92 soggetti erano donatori di sangue. Lo stato di salute dei soggetti reclutati è stato accertato mediante esecuzione di un pannello standard di esami ematochimici: nessuno dei soggetti considerati è risultato affetto da insufficienza renale, né da malattie epatiche o pancreatiche. Altri 5 soggetti, per i quali erano stati rilevati valori di amilasi pancreatica elevati, sono stati esclusi dalla valutazione statistica. Le analisi sono state eseguite su analizzatore automatico Olympus AU640 (Olympus, Milano) alla temperatura di 37 °C, utilizzando reagenti forniti da Sentinel (Milano). I valori di lipasi osservati sono risultati compresi fra 13 U/L e 44 U/L; non si è osservata variazione della lipasi dipendente dall'età dei soggetti. Il confronto tra mediane, eseguito con il test di Wilcoxon per campioni indipendenti, ha permesso di escludere differenze significative nei confronti eseguiti tra i valori osservati per i seguenti gruppi: pazienti ambulatoriali femmine vs pazienti ambulatoriali maschi ($p = 0,36$), donatori femmine vs donatori maschi ($p = 0,99$), pazienti ambulatoriali vs donatori ($p = 0,98$), pazienti ambulatoriali femmine vs donatori femmine ($p = 0,81$), pazienti ambulatoriali maschi vs donatori maschi ($p = 0,48$) e femmine vs maschi ($p = 0,46$). Sulla base di questa osservazione, tutti i soggetti ($n = 237$) sono stati considerati appartenenti ad una popolazione omogenea. Poiché la distribuzione dei valori di lipasi in questa popolazione non risultava essere di tipo gaussiano, le ulteriori valutazioni sono state effettuate utilizzando metodi statistici non parametrici. La mediana dei valori di concentrazione di attività catalitica della lipasi è risultata pari a 24,0 U/L (intervallo di confidenza al 90 %: 23,4 – 24,6 U/L), il valore del percentile 2,5 è risultato 17,2 U/L (intervallo di confidenza al 90 %: 15,7 – 17,7 U/L) ed il valore del percentile 97,5 è risultato 37,8 U/L (intervallo di confidenza al 90 %: 35,0 – 43,4 U/L).

233

ELETTROFORESI CAPILLARE: PROBLEMATICHE LEGATE A PRESTAZIONI ANALITICHE E INTERPRETAZIONE DEI TRACCIATI.

Mazzucato P., Ponchia S., Marchioro L., Altinier S., Varagnolo M., Zaninotto M., Mussap M., Plebani M.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale, Padova.

La separazione elettroforetica delle proteine sieriche è una tecnica riconosciuta nello screening delle proteine per l'identificazione delle gammapatie monoclonali. Inoltre può rappresentare un ausilio nella diagnosi di stati patologici associati a variazioni dei valori proteici. L'elettroforesi capillare zonale (CZE) si è affermata come una tecnica analitica innovatrice con numerosi vantaggi tra i quali l'elevata sensibilità da cui deriva una elevata efficacia nello screening e monitoraggio delle componenti monoclonali (c.m.). Per garantire l'affidabilità del risultato nel corso del monitoraggio dei pazienti, vanno verificate e assicurate prestazioni analitiche di elevata qualità, in particolare relativamente alle caratteristiche di imprecisione. L'obiettivo del lavoro è stato quello di valutare le prestazioni strumentali di 5 analizzatori automatici per l'elettroforesi capillare (sistema Paragon CZE 2000 - Beckman Coulter) e contemporaneamente di stimare l'imprecisione tra gli operatori nella lettura, interpretazione e quantificazione delle c.m. presenti in campioni di pazienti sottoposti all'analisi. La variabilità analitica degli strumenti (CV%) è stata verificata utilizzando campioni di controllo con quadro sieroproteico normale e patologico analizzati all'inizio di ogni giornata di lavoro. I risultati hanno evidenziato, per tutte le frazioni proteiche e per ciascun strumento, coefficienti di variazione compresi tra 0,6 e 10,3 % a garanzia dell'elevata affidabilità e robustezza strumentale. Per la stima invece dell'imprecisione legata alla lettura e alla quantificazione delle c.m., ogni campione selezionato è stato sottoposto in triplo all'analisi su tre strumenti diversi e per tre giorni consecutivi. I risultati ottenuti evidenziano imprecisioni di lettura estremamente contenute, essendo il CV compreso tra 0,3 e 5,5 % anche in presenza di c.m. di lieve entità. Nonostante sia stata notata una maggiore difficoltà di quantificazione in caso di c.m. migrante in zona β-globulinica, l'imprecisione osservata (CV tra 1,9 e 6,1 %) non determina una differente classificazione del paziente.
In conlusione possiamo ritenere affidabile l'organizzazione di una routine di laboratorio che preveda l'impiego di 5 analizzatori per elettroforesi capillare e più operatori dedicati alla interpretazione delle c.m., in quanto sono risultate più che soddisfacenti le prestazioni strumentali, la concordanza interpretativa dei tracciati e la quantificazione delle c.m..

234

MITOCHONDRIA REDOX STATE IN BILIARY CIRRHOSIS

Ippolito S.*˜; Mani A.R.˜; Ollosson R.˜; Harry D.˜; Moore K.˜

*Dpt. Scienze Mediche, Universita' degli Studi, Ospedale Maggiore IRCCS, Milano, Italia.
˜Centre for Hepatology, Royal Free & University College Medical School Rowland Hill Street, NW3 2PF, London, UK

Mitochondrial redox state is particularly important in response to oxidative stress as normal mitochondrial function is vital for cell survival and apoptosis. The aim of our study was to investigate the mitochondrial redox state (as measured by reduced thiol content in mitochondrial proteins, -SH) in rat model of biliary cirrhosis using a proteomic approach. Eight Sprague Dawley rats were used in the study. Biliary cirrhosis was induced by surgical ligation of the bile duct under general anesthesia (n=4). Sham-operated animals were served as controls (n=4). Four weeks after the operation the animals were sacrificed and the liver and heart mitochondria were isolated. The isolated mitochondria were incubated with IBTP (4-iodobutyl-triphenylphosphonium, 5μM per 1mg/ml of mitochondria preparation). IBTP is a lipophilic cation that accumulates in the mitochondria and yields stable thioether adducts in a thiol-specific reaction. Western blotting with anti-IBTP primary antibody and chemioluminescent development was used to visualize the IBTP-bound proteins.
The results showed an increased -SH in mitochondrial proteins in cirrhotic liver mitochondria vs control, while in the heart there was no difference.
We suggest that a compensatory mechanism is involved in the liver to protect the vitality of mitochondria that are important for efficient metabolism. To confirm this we need to perform a bidimensional electrophoresis and MALDI TOF investigation looking for the protein(s) involved in this eventual compensatory mechanism.

235

MODULATION BY HOMOCYSTEINE OF eNOS, iNOS AND ARGINASE ACTIVITIES AND NO PRODUCTION IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS

Pinna G.G.; Naitana A.; Pantaleo A.

Department of "Scienze Biomediche, sezione di Biochimica", University of Sassari, Italy

Endothelial cells synthesize the vasodilator substance nitric oxide (NO), which causes relaxation of vessel's smooth muscular cells, from L-arginine by catalysis of NO synthase (eNOS). Some substances, mainly cytokines have been shown to induce also an iNOS activity in endothelial cells. The impairment in the production and/or the bioavailability of nitric oxide is defined as endothelial dysfunction, a situation found in cardiovascular diseases, diabetes, hyperhomocysteinemia, preeclampsia and end-stage renal disease. The aminoacid L-arginine can be metabolized also by the enzyme arginase, with the production of urea and ornithine, that can lead to polyamine and/or proline synthesis. Thus, an increased utilization of L-arginine by arginase would parallel a decreased eNOS activity and NO production. We have induced endothelial dysfunction in a line of immortalized HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) by treatment with L-homocysteine (HCys) 0,5-4 mM for 24 hrs. Progression of endothelial dysfunction was monitored by LDH activity increase in culture medium. eNOS, iNOS and arginase enzymatic activities were assayed in homogenates of harvested cell and NO production in conditioned culture medium. Our preliminary results show that: eNOS activity decreases and arginase activity increases as HCy concencentration raises. NO production shows a decrease at low and an increase at high HCy concentrations. Parallel to the increase in NO output from cells we have observed the appearance of an iNOS activity. It seems therefore that, in cultured endothelial cells, high HCy concentrations are capable of depressing eNOS and stimulating iNOS activities. The latter enzyme would be responsible of the raise in NO production.

_____
This work was supported by a grant of Regione Sardegna, Assessorato alla Sanità, to GGP.

236

ATIPICA MIGRAZIONE DEGLI ISOENZIMI DELLA FOSFATASI ALCALINA IN PAZIENTE CON NEOPLASIA DEL POLMONE.

Baroni S., Rocchetti S., Muratore M.T.(1), Mascagna G., Capone R., Zuppi C.

Laboratorio di Chimica Clinica e Analisi Ormonali Policlinico A.Gemelli, Università Cattolica, Roma
Laboratorio Analisi. Ospedale Civile, Viterbo (1)

Descriviamo il caso di un paziente di 79 anni con recidiva locale di neoplasia polmonare (carcinoma epidermoidale), diagnosticata 18 anni fa e trattata con radioterapia e chemioterapia (ultimo ciclo marzo 2002), senza evidenze radiologiche e scintigrafiche di metastasi ossee e/o epatiche. Durante un recente ricovero per insufficienza respiratoria, sono stati per la prima volta richiesti gli isoenzimi della fosfatasi alcalina, in aggiunta agli usuali test ematochimici di follow up. Il paziente conserva una buona funzionalità renale ed epatica e mostra solo un significativo aumento del CYFRA 21.1 rispetto al controllo precedente (7.05 vs 1.75 ng/ml; cut-off 3.3); all'elettroforesi proteica si evidenzia un debole addensamento omogeneo nella regione paramediana delle gammaglobuline, tipizzato come IgG k.
L'attività totale della fosfatasi alcalina (ALP, metodo colorimetrico a 37°C con substrato p-nitrofenilfosfato) è di 201 UI/L (v.n. 98-279). La separazione degli iso-ALP eseguita con Hydragel Iso-Pal – Sebia, su gel di agarosio, ha evidenziato una migrazione rallentata con una grossa banda nella zona intestinale e debolissime bande nelle zone epatica, ossea e biliare. Nella corsa con lectina abbiamo osservato una consistente banda nel punto di deposizione e una banda residua, leggermente più catodica rispetto alla grossa banda osservata nella corsa senza lectina.
Per identificare la natura di queste bande atipiche abbiamo eseguito:
1. separazione isoALP (Sebia) dopo inattivazione al calore 56°C per 20 min e a 65°C per 15 min.
2. separazione isoALP con inibizione con neuraminidasi (REP- Helena)
3. precipitazione con PEG 8000 al 24% w/v a 37°C per 19 min e separazione isoALP (Sebia) sul sovranatante.
4. dosaggio quantitativo dell'isoenzima osseo (Ostase, Beckman in RIA)

Sono stati inoltre dosati altri markers di metabolismo osseo quali osteocalcina, PTH e beta cross-laps (ECLIA, Roche).
Le prove eseguite hanno confermato la presenza di un macroenzima presumibilmente dovuto ad un complesso IgG k in paziente con normale attività totale di fosfatasi alcalina.

237

VALORE DIAGNOSTICO DELLA PROCALCITONINA NEGLI EPISODI FEBBRILI IN CORSO DI CHEMIOTERAPIA AD ALTE DOSI (HDCT)

Passerini R.; Lentati P.; Moretti L.; Salvatici M.; Urso V.; Zorzino L.; Sandri M.T.

IRCCS - Istituto Europeo di Oncologia, Milano

L'insorgenza di un episodio febbrile si presenta nella quasi totalità dei pazienti in trattamento chemioterapico ad alte dosi (HDCT); al primo posto fra le cause, con una incidenza del 30% circa, sono le infezioni di origine batterica, che spesso hanno un decorso e una sintomatologia ingannevoli. Poiché esse sono causa di decesso nel 70% circa dei pazienti con leucemia acuta e nel 50% di quelli con linfomi o tumori solidi, una diagnosi precoce risulta fondamentale. Fra i parametri di laboratorio utilizzati la procalcitonina (PCT) riveste un particolare interesse clinico in quanto ha una elevata specificità per le infezioni batteriche gravi, una buona stabilità in circolo e non risulta influenzata da patologie concomitanti, fra cui quella neoplastica.
In questo studio ci siamo proposti una valutazione su pazienti ematoncologici in corso di HDCT dei valori di PCT e PCR, del loro andamento nel tempo, con un confronto fra batteriemie da Gram negativi e Gram positivi e fra pazienti neutropenici e non neutropenici: abbiamo raccolto i dati relativi a 167 pazienti, cui, al rialzo febbrile, sono stati eseguiti l'emocoltura, indagini microbiologiche mirate e almeno una radiografia del torace; a tutti sono stati effettuati prelievi per il dosaggio di PCT (LUMITEST, BRAHMS DIAGNOSTICS), PCR (TINA - QUANT, Integra 800 Roche), e conteggio dei WBC (Se 9000, Sysmex TOA) nei giorni –1, 0, fino in 5^ giornata.
La media geometrica della PCT nelle FUO (0.25) risulta statisticamente differente dalle batteriemie (0.51), dalle infezioni polmonari (0.57) e d'altro sito (0.55) con $p<0.0001$; nelle batteriemie i valori più elevati si riferiscono alle infezioni da Gram negativi. Le medie geometriche della PCR nelle infezioni polmonari e d'altro sito non sono statisticamente differenti, come non lo sono fra batteriemie (73) e FUO (61). Le variazioni nel tempo della PCT in corso di infezione sono significative fra i giorni 0 e +1, +1 e +4, +1 e +5; le variazioni della PCR nelle FUO e nelle infezioni hanno lo stesso andamento.
Concludendo la PCT in corso di FUO sembra avere un alto valore predittivo negativo, nel monitoraggio delle infezioni è più specifica della PCR e orienta la diagnosi con un discreto anticipo rispetto alle indagini microbiologiche, anche se la presenza di falsi negativi ne limita l'utilizzo nelle scelte terapeutiche; i suoi valori mediani non sembrano influenzati dalla neutropenia: la PCT può quindi considerarsi ausilio diagnostico negli episodi febbrili a seguito di HDCT.

238

GLICOIDROLASI DI MEMBRANA IN SOGGETTI ANZIANI SANI DURANTE L'INVECCHIAMENTO DELL'ERITROCITA.

Goi G.[a]; Massaccesi L.[a]; Cazzola R.[b]; Tringali C.[a]; Baquero Herrera C.[a]; Russo Volpe S.[b]; Rondanelli M.[c]; Ferrari E.[c]; Antoniello N.[d]; Cestaro B.[b]; Lombardo A.[a]; Venerando B.[a]

[a] Dip. Chimica, Biochimica e Biotecnologie per la Medicina, Milano.
[b] Dip. di Scienze Precliniche – L.I.T.A. Ospedale Sacco**,** Milano
[c] Dip. di Medicina Interna e Terapia Medica, cattedra di Geriatria, Pavia
[d] Direzione Medica, Azienda di Servizi alla Persona (ASP), Istituzioni Assistenziali Riunite (II.AA.RR.), Pavia.

Scopo. Valutare le potenzialità delle glicoidrolasi presenti sulle membrane eritrocitarie [1] quali markers precoci di alterazioni strutturali e funzionali della membrana nel processo fisiologico dell'invecchiamento dell'eritrocita. **Metodi**. Sono stati esaminati 400 soggetti anziani dei quali ne sono stati selezionati 13 (82 ± 6 anni) privi di patologie e un gruppo di riferimento di 13 soggetti giovani (26 ± 3 anni). Per tutti i soggetti sono stati determinati i perossidi plasmatici e le potenzialità plasmatiche antiossidanti totali. Gli eritrociti sono stati separati in giovani, medi e senescenti, utilizzando un gradiente discontinuo di Percoll. Sono stati dosati, con metodologia fluorimetrica, i seguenti enzimi: ß-D-glucuronidasi, α-D-glucosidasi, sialidasi acida e neutra. È stato dosato il contenuto di acido sialico totale e misurata l'anisotropia di fluorescenza utilizzando il 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. **Risultati**. L'invecchiamento è associato ad uno stress ossidativo sistemico che influenza l'integrità delle membrane cellulari. Esiste una stretta associazione tra stress ossidativo e glicoidrolasi della membrana. La percentuale di distribuzione degli eritrociti giovani, di media età e senescenti è pressoché identica nei soggetti anziani e giovani. Il contenuto di acido sialico diminuisce con l'invecchiamento dell'eritrocita in entrambe le popolazioni. L'anisotropia di fluorescenza è identica negli eritrociti giovani e di media età di entrambe le popolazioni mentre si osserva un incremento negli eritrociti senescenti, maggiore nei soggetti anziani. Ad eccezione della sialidasi neutra, sia nei soggetti giovani sia negli anziani, si osserva una progressiva diminuzione delle attività enzimatiche nel corso dell'invecchiamento eritrocitario. I livelli della ß-D-glucuronidasi negli eritrociti giovani e di media età sono nettamente più bassi negli anziani, mentre per l'α-D-glucosidasi e sialidasi acida, i valori sono di poco differenti. La sialidasi neutra aumenta con il progredire dell'età eritrocitaria nei due gruppi di soggetti e, negli eritrociti senescenti degli anziani, è circa il 50% rispetto ai giovani. **Conclusioni**. La valutazione di glicoidrolasi della membrana eritrocitaria fornisce indicazioni precoci e utili per segnalare alterazioni strutturali e funzionali della membrana eritrocitaria.

[1] Goi, G. et al. (2000) Membrane anchoring and surface distribution of glycohydrolases of human erythrocyte membranes. FEBS Letters. 473, 89-94.

239

ABITUDINI ALIMENTARI E BIOMARCATORI NUTRIZIONALI NELLE FAMIGLIE DEI DIABETICI DI TIPO 1 E NEI SOGGETTI DI CONTROLLO SUL TERRITORIO PISANO

°Rossi L., Matteucci E., Passerai S., *Mariotti M., Fagnani F., Evangelista I., °Innocenti B., °Casini M., Giampietro O.

Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa; *Servizio Dietetico, °Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1,
Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro
Alimentazione e stile di vita influenzano profondamente lo stato di salute. Abbiamo confrontato stile di vita, apporto dietetico abituale e biomarcatori dello stato nutrizionale nelle famiglie di pazienti diabetici tipo 1 (T1DM) vs soggetti sani di controllo senza familiarità diabetica.
Materiali e metodi
Abbiamo usato l'European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition questionnaire per valutare apporto dietetico e stile di vita in 38 pazienti con T1DM, 76 parenti, e 95 controlli sani.
Risultati
Sono stati registrati gli indici antropometrici e dosati biomarcatori, quali concentrazione plasmatica di albumina, ferro, lipidi, omocisteina, vitamine B9 e B12, escrezione urinaria di azoto, sodio e potassio.
E' emerso quanto segue:
Il 45% dei controlli sani era soprappeso. L'età era associata con un progressivo incremento del peso corporeo ed una riduzione dell'attività fisica abituale a fronte di un invariato apporto calorico giornaliero.
L'apporto calorico derivato da grassi totali e colesterolo era superiore a quello consigliato dalle linee guida generali. Il consumo giornaliero di fibre superava i 25 g/d solo nel 27% di tutti i partecipanti.
L'apporto giornaliero stimato della vitamina idrosolubile B9 e delle vitamine liposolubili D ed E era insufficiente rispetto all'apporto dietetico raccomandato.
Abitudini alimentari e di stile di vita più sane erano maggiormente frequenti nelle donne e nei pazienti con T1DM (in questi, probabilmente, in seguito all'intervento educativo). Al contrario, il coinvolgimento dei familiari in termini di cambiamento di comportamenti inidonei era nullo.
Discussione e conclusioni
Lo studio dimostra, nella popolazione pisana, la diffusione di comportamenti alimentari non corretti, tali da predisporre a soprappeso, diabete e complicanze cardiovascolari. Il deficit combinato di vitamina B9 ed E potrebbe influire negativamente sulla funzione endoteliale, poichè questi antiossidanti sono implicati nella modulazione di vie di traduzione ossido nitrico- ed eicosanoido-dipendenti.

240

EFFECTS OF G-CSF ON INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR SYSTEM AND BETA2-MICROGLOBULIN LEVELS IN PRETERM NEONATE

Capoluongo E., § Vento G.,# Ameglio F.*, Lulli P.,§ Santonocito C.,# Santini S.A.,§ Rocchetti S., Antenucci M, Carrozza C., Romagnoli C.,# Giardina B.,§ and Zuppi C.§

§ Biochemistry and Clinical-Biochemistry Institute; # Division of Neonatology, Catholic University, Rome, Italy; *Laboratory of Clinical Pathology of the General Hospital "S. Giovanni Calibita" Fatebenefratelli/AFAR, Rome, Italy.

Background: Fibrosis is one of the main characteristics of Chronic Lung Disease of prematurity (CLD). The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), a cytokine that stimulates the precursor proliferation, maturation and functions of neutrophils and monocytes, is currently used to prevent or treat neonatal sepsis in preterm neutropenic patients. IGF-I is a strong pro-fibrogenic mediator, secreted by alveolar macrophages in the lung, that can act as a potent mitogen and stimulator of collagen synthesis by fibroblasts, while beta2-m could exert a role in lung fibrogenesis.
Methods: 35 preterm neonates with hyaline membrane disease and 16 preterm neutropenic babies with the same disease were observed for CLD development. The assays of total IGF-I, free IGF-I, IGFBP-3 and B2M were performed on epithelial lining fluid samples collected, with a standardized procedure, by 8 out of 16 neutropenic premature newborns treated with G-CSF.
Aim: To evaluate the relationship between the effects of G-CSF therapy and the BAL levels of IGF-1 system and beta2-m.
Results: 25% of the neonates with hyaline membrane disease without neutropenia developed CLD versus 77% of the neutropenic ones treated with G-CSF. In this group, BALF cell count showed a progressive increase in absolute number of WBC until the fourth day of life. Concomitantly, all the variables studied were found significantly increased over third and fourth day after rhG-CSF administration, with subsequent slow decline at the fifth and sixth day. In particular, free IGF-I showed the largest increment after therapy.
Conclusions: These findings open the possibility that G-CSF treatment will induce an increased IGF-I molecules synthesis by sensitive cells in the lung, leading to enhanced fibrogenic mechanisms, as suggested by the observation that G-CSF-treated neutropenic preterm newborns developed CLD more frequently than the untreated group. Molecular in vitro studies needed to establish the biological effects of this cytokine on ELF cells.
References. Vento G, Matassa PG, Ameglio F, Capoluongo E, Tortorolo L, Romagnoli C. Effects of early dexamethasone on pulmonary fibrogenic mediators and respiratory mechanics in preterm infants. Eur Cyt Netw 2002;13:207-14.

241

CERULOPLASMIN AND TRANSFERRIN LEVELS IN CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Deiana G.A.; Corda D.; Rosati G.; Barrocu M.; Zucca G.; Sechi G.P.

Neurological Clinic, University of Sassari, Sassari.

Recent studies have implicated oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). In particular, the free radicals seem implicated in the acute myelin damage induced by macrophages and an excessive deposition of redox-active iron (Fe++) in affected white matter is known to play a key role as generator of reactive oxygen species.
Ceruloplasmin and transferrin, two glycoproteins present in plasma and CSF, have a leading role in normal iron homeostasis and free radicals defense. Transferrin is also essential to physiological myelinogenesis in the central nervous system (CNS). In normal conditions these proteins are present in cerebrospinal fluid (CSF) at very low concentrations as soluble form secreted by epithelial cells of choroid plexus. Transferrin is also produced and localised within olygodendrocytes; while, an anchored form of ceruloplasmin has been found on the surface of glial cells.
We studied the serum and CSF levels of ceruloplasmin and transferrin in 19 patients with definite relapsing-remitting MS, treatment free for at least 3 months, and in 9 normal controls. In all patients the integrity of blood-brain barrier (BBB) was evaluated by the albumin CSF/serum concentration quotient, the total protein CSF concentration and the absence of contrast enhancement at brain MR imaging.
Ceruloplasmin and transferrin levels were determined in serum and concentrated CSF by immunodiffusion. Our data showed that in MS patients the CSF ceruloplasmin levels were significantly increased compared with normal controls ($p<0.05$). CSF transferrin levels did not differ significantly from controls.
Increased CSF ceruloplasmin levels in MS patients have been also pointed out in a previous study; however, this finding has been thought to be due to an altered BBB. Since in our study the integrity of BBB has been carefully evaluated, the increased CSF ceruloplasmin levels in MS patients seem due to an intratecal overproduction of this glycoprotein, perhaps from the damaged cells in demyelinating areas of CNS. The functional role of the intratecal overproduction of ceruloplasmin in MS patients is unknown. Since this glycoprotein is involved both in iron homeostasis and physiological myelinogenesis, its intratecal overproduction could be a defense mechanism to protect the normal myelin against iron induced oxidative injury.

242

USEFULNESS OF SERUM PEPSINOGENS AND THE ORAL SUCROSE TEST FOR EVALUATION OF H. PYLORI-RELATED CHRONIC GASTRITIS

Cavallaro L.G.; Moussa A.M.; Merli R.; Bertolini S.; Iori V.; Cavestro G.M.; Caruana P.[1]; Dal Bó N.[2]; Rugge M.[3]; Basso D.[4]; Plebani M.[4]; Di Mario F.

Chair of Gastroenterology, Department of Clinical Sciences, University of Parma; [1]Pathologic Institute, University of Parma; [2]Gastroenterology Unit, Hospital of Treviso; [3]Pathologic Institute, University of Padova; [4]Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy.

Aim: To study the relationship between two non-invasive tests, serum pepsinogens levels and oral sucrose test, H. pylori infection and histopathological patterns associated with chronic gastritis. Patients and Methods: 45 consecutive outpatients referred for dyspeptic symptoms were studied. All patients underwent endoscopy with biopsies. Urinary sucrose excretion and serum pepsinogens I and II were measured by spectrophotometry and immunoassay methods respectively. Results: Pepsinogens levels were statistically increased in H. pylori positive patients (sPGI: 87±32 in Hp-ve vs127±61 in Hp+ve, p=0.017; sPGII: 8±3 in Hp-ve vs16±9 in Hp+ve, p=0.000). SPGI increased according to the degree of antrum inflammation (99±36 in absent/mild vs 142±68 in moderate/severe, p=0.020; r=0.43, p=0.003). SPGII significantly increased with the severity of gastritis, both in the antrum and in the corpus (10±7 in absent/mild and 18±9 in moderate/severe antrum inflammation p=0.0017, r=0.56, p=0.000; 12±8 in absent/mild and 19±9 in moderate/severe corpus inflammation, p=0.012, r=0.67, p=0.000). Sucrose excretion increased significantly only the corpus inflammation (0.11±0.12 in absent/mild and 0.30±0.31, p=0.028 in moderate/severe; r=0.40, p=0.006). SPGII and sucrose excretion were correlated, particularly in H. pylori positive patients (r=0.44, p=0.02). Conclusions: Serum pepsinogens levels are useful in the severity and topography of chronic gastritis, but are also directly influenced by Hp infection. Oral sucrose test detects disruption of the gastric mucosal layer in severe corpus gastritis.

243

TOPOGRAPHY OF HISTOLOGICAL GASTRIC DAMAGE: CLINICAL USEFULNESS OF SERUM PEPSINOGENS AND GASTRIN- 17.

Cavallaro L.G.; Moussa A.M.; Caruana P.[1]; Merli R.; Dal Bó N.[2]; Rugge M.[3]; Cavestro G.M.; Aragona G.; Plebani M.[4]; Basso D.[4]; Leandro G.[5]; Di Mario F.

Chair of Gastroenterology, Department of Clinical Sciences, University of Parma; [1]Pathologic Institute, University of Parma; [2]Gastroenterology Unit, Hospital of Treviso; [3]Pathologic Institute, University of Padova; [4]Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy; [5]Gastroenterology Unit, Castellana Grotte.

Background: Endoscopy with biopsies is considered the gold standard for the diagnosis of gastritis. Alternative non-invasive tests based on serum pepsinogens have been introduced since ’80 as “serological biopsy” of gastric mucosa. Aim: To assess gastric mucosa status by serological analysis using sPGI, sPGII and gastrin-17 including serum pepsinogens I (sPGI), II (sPGII), gastrin-17 (G-17). Patients and methods: 149 consecutive patients (91 females, mean age 49 years, range 18-88 years) with dyspeptic symptoms were studied. Sera from subjects examined with gastroscopy and biopsies (2 antrum, 2 corpus) were analysed for sPGI (mcg/L), sPGII (mcg/L) and G-17 (pmol/L) levels. Subjects were subdivided in three groups according to the histological findings: 61 patients with normal gastric mucosa, 67 (60 Hp+ve) with non atrophic chronic gastritis (NACG) and 21 (10 Hp+ve) with atrophic chronic gastritis (ACG). Results: Both serum pepsinogens were higher in Hp+ve than in Hp-ve patients. NACG patients had higher levels of both serum pepsinogens than normal and ACG patients. This latter group had the lowest sPGI and sPGI/sPGII ratio levels and higher G-17 levels. Patients with Hp related and diffused NACG had lower sPGI than antrum predominant Hp NACG. Corpus predominant Hp NACG had lower sPGI/sPGII ratio than antrum predominant. Conclusion: The studied parameters can be useful to screen normal gastric mucosa and various patterns of non atrophic gastritis from precancerous conditions, by means of a correct topography of the gastric damage.

244

COINFEZIONE HIV-HCV E LIVELLI SIERICI DI CISTEINA E ZINCO.

Veccia S.(^), Caldaroni L. (*), Coppa G.(*), Radi B.(^), Del Prete S.(^), D'Amato G. (^), Silvestri C.(^), Cinti B.(*), Tocchini M.(*), Scalise G.(^)

(*) Laboratorio Analisi – Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti di Ancona"
(^) Clinica delle Malattie Infettive – Università di Ancona

Obiettivi: valutare, nei soggetti con infezione da HIV, alterazioni dei livelli sierici di zinco e cisteina in presenza di confezione da HCV.
Metodi: sono stati reclutati 22 soggetti HIV positivi (11 uomini ed 11 donne) di età compresa tra i 23 e i 57 anni di cui 8 (5 maschi e 3 femmine) con linfociti CD4 >400 mmc naive per terapia antiretrovirale, e 14 (6 maschi ed 8 femmine) con linfociti CD4<300 mmc in trattamento antiretrovirale stabile da almeno tre mesi. E' stato inoltre reclutato un gruppo di 10 soggetti sani quale controllo. Tra i soggetti HIV positivi, 9 presentavano una confezione con HCV (6 maschi e 3 femmine); nessuno di questi presentava una cirrosi epatica o segni di scompenso epatico. Ad ogni soggetto è stato effettuato un prelievo ematico, a digiuno dalla sera precedente, su cui sono state effettuate le determinazioni su siero di zinco (v.=70-100 µsr/decilitro), tramite metodo spettrofotometrico, e cisteina (v.=248-312 µmoli/litro), tramite metodo HPLC (cromatografia liquida ad alta risoluzione).
Risultati: Livelli sierici di cisteina inferiori alla norma sono stati testati in 17 soggetti sui 22 HIV+ ed in 2 soggetti del gruppo dei sani. Valutando esclusivamente i coinfetti si è notato che tutti e 9 presentavano livelli di cisteina inferiori alla norma. Confrontando con test t per campioni non appaiati a due code i coinfetti dai soggetti anti HCV negativi si è notata, accettando un livello di significatività del 5%, una differenza significativa (P=0,017). Per quanto riguarda lo zinco, 15 soggetti (di cui 8 coinfetti) su 22 presentavano valori al di sotto della norma. Anche in questo caso, il confronto tra confetti e non, sempre tramite test t, ha mostrato una differenza significativa (P=0,025)
Conclusioni: La presenza di infezione da HIV comporta turbe nutrizionali e metaboliche; il sovrapporsi di un'altra infezione cronica, pur in assenza di un danno epatico clinicamente rilevabile, accentua questi squilibri. A nostro avviso elementi e molecole che hanno un ruolo sia sullo stato ossido-riduttivo che nella regolazione del sistema immunitario, vanno incontro ad un maggior consumo o ad una loro distrettualizzazione in sedi extra-ematiche. Il loro dosaggio appare interessante anche nell'ottica di una possibile correzione tramite un apporto nutrizionale.

Mocchegiani E., et al: Ann.N.Y.Acad.Sc., 1992; 650: 94-98.
Mansoor MA, et al: Anal. Biochem., 1992; 200: 218-229.

245

EMODIALISI E STRESS OSSIDATIVO

*L. Rossi, *B. Innocenti, E. Battipaglia, A. Cupisti, O. Giampietro, E. Matteucci

*Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Az. Osp. Pisana; Dip. Med. Interna, Università di Pisa

Scopo del lavoro: valutazione lo stato di ossidazione di pazienti con insufficienza renale cronica e di misurare gli effetti del trattamento emodialitico (HD) sullo stato antiossidante generale, con particolare attenzione all'ossidabilità di lipidi e proteine (MDA e gruppi SH). I biomarcatori di ossidazione sono stati monitorati all'inizio e alla fine della sessione dialitica. Abbiamo studiato 25 pazienti uremici (14 M/ 11 F) di età compresa tra i 25 e i 71 anni, in trattamento emodialitico cronico da 71.2 ± 64.1 mesi e 25 soggetti sani di controllo.
Materiali e metodi: quattordici pazienti erano trattati con bicarbonato emodialisi (BIC HD) e 11 con emodialfiltrazione (HDF). Sono state utilizzate le seguenti membrane: polisulfone (n=16); poliacrilonitrile AN 69 (n=9). L'efficienza dialitica media Kt/V (clearance dialitica dell'urea, K, per il tempo di dialisi, t, diviso il volume di distribuzione corporea dell'urea, V), è stata di 1.5 ± 0.3 Il calo ponderale al termine della sessione dialitica, espressione dell'ultrafiltrato netto, è stato di 3.09±1.05 Kg. La popolazione di controllo era costituita da un ugual numero di soggetti sani, di età compresa tra i 21 e i 73 anni; sono stati raccolti i dati anagrafici, clinici ed anamnestici dei soggetti studiati, i quali hanno rilasciato il loro consenso informato. A tutti i pazienti ed ai soggetti di controllo sono state effettuate le seguenti determinazioni ematochimiche:
esame emocromocitometrico, glicemia a digiuno, acido urico, colesterolo totale, trigliceridi, albumina, sodio, potassio, contenuto plasmatico ed eritrocitario di MDA (in accordo al metodo di Esterbauer e Cheeseman) e gruppi –SH plasmatici (secondo il metodo di Ellman).
Risultati: i pazienti uremici presentavano livelli basali di albumina e gruppi –SH plasmatici significativamente inferiori rispetto ai soggetti di controllo, mentre il contenuto plasmatico ed eritrocitario di MDA erano significativamente più elevati; questi dati confermano che i pazienti uremici sottoposti a trattamento emodialitico cronico si trovino in una condizione di aumentato stress ossidativo. Al termine della sessione dialitica, i gruppi –SH plasmatici hanno subito un incremento significativo mentre il contenuto plasmatico ed eritrocitario di MDA una significativa diminuzione, indicando un miglioramento dello stato ossidativo.
Discussione e conclusioni: La variazione nella concentrazione dei gruppi sulfidrilici liberi delle proteine plasmatiche (concentrazione basale - concentrazione post-dialisi) è risultata correlare negativamente con l'ultrafiltrato mentre la variazione nella concentrazione eritrocitaria di MDA correlava negativamente con l'efficienza dialitica. La misurazione dei gruppi sulfidrilici liberi delle proteine plasmatiche, maggiormente localizzati sull'albumina, è stata utilizzata per asserire lo stato di ossidazione delle proteine plasmatiche.

246

RECOVERY OF GASTRIC FUNCTION AFTER H. PYLORI ERADICATION IN SUBJECTS WITH BODY ATROPHIC GASTRITIS: A PROSPECTIVE FOUR YEARS STUDY.

Moussa A.M.; Dal Bò N.[1]; Caruana P.[2]; Cavallaro L.G.; Aragona G.; Cavestro G.M.; Iori V.; Merli R.; Bosi S.; Venerito M.; Colla G.[3]; Pilotto A.[4]; Basso D.[5]; Plebani M.[5]; Di Mario F.

Department of Clinical Sciences, Chair of Gastroenterology, University of Parma; [1]Gastroenterology Unit, Treviso; [2]Chair of Pathology, Parma, Italy; [3]Gastroenterology Unit, Parma; [4]Geriatrics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo; [5]Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy.

Background: The effects of H. pylori eradication on atrophic changes of gastric mucosa are debated. Few studies reported a partial restoring on serum pepsinogen I (sPGI) almost non related with real changes in gastric mucosal morphology. Aim:to verify the modifications of gastric function, after H. pylori eradication on moderate/severe body atrophic gastritis by means of a non-invasive test, i.e serum pepsinogen I. Patients and Methods: Twenty-three dyspeptic patients (11M, mean age:51.8,range:29-79years) with histological feature of moderate/severe body atrophic gastritis and sPGI<25mg/L with, selected from 284 consecutive Hp+ve patients, underwent to upper gastrointestinal endoscopy with biopsies and sPGI determination at baseline. After successfull of eradication therapy; during the first year of follow-up, at 6 month control by means of a blood sample for determination of PGI has been planned, subsequently during the second, thirth and fourth year, single annual blood collection. Results: The mean of sPGI prior eradication was 11.9mg/L (range:4-23mg/L). Six months after eradication therapy, the mean sPGI levels significantly increased to 17.4 mg/L (p=0.04) and after four years to 32.7mg/L(p=0.01); lasting the follow-up, a continuous increase in the sPGI levels was noted (one year vs 6 months: 23.9mg/L vs 17.4mg/L) and two years vs one year (26mg/L vs 23.9mg/L; p=0.01). Besides, we found a progressive increasing number of subjects with sPGI level higher than the cut-off value of 25 mg/L in different steps of follow-up; at six months 1/16(6.3%), 5/15(33.3%) at one year, 7/14(50%) at 24 months, 6/9(66.7%) at 36 months and 7/8(87.5%) at four years. Conclusion: Our study reports the improvement of physiological gastric function, namely the sPGI secretion in subjects with body atrophic gastritis, after Hp eradication.

247

EVALUATION OF DIFFERENT MARKERS TO PREDICT VENTILATOR ASSOCIATED PNEUMONIA SEVERITY IN BRAIN INJURED PATIENTS.

Melzi d'Eril[1] GV; Pelosi[2] P.; Finazzi[3] S.; Gomiero[2] B.; Pallotti[1] F.; Cecchin[2] A.; Merlini[4] G.; Barassi[1] A.

[1]DECBS, Univ. of Insubria, Varese. [2]DCBS, Univ. of Insubria, Varese. [3]Legnano Hospital, Legnano. [4]Biotech. Res. Labs., IRCCS Policlinico S.Matteo, Univ.of Pavia.

INTRODUCTION. Ventilator-associated pneumonia (VAP) is a frequent complication during mechanical ventilation. We investigated the role of different biochemical markers [white blood cell (WBC), procalcitonin (PCT), c-reactive protein (CRP) and serum amyloid (SAA)] to predict VAP without (VAP no-severe) or with severe sepsis/septic shock (VAP severe). METHODS. We studied 34 brain injured patients: 17 no-VAP group [age 37±17, sex 10M/7F, Glasgow Coma Score (GCS) 5.6±2.2, head-trauma/haemorrhage 10/7] and 17 VAP group [age 52±21, sex 12M/5F, GCS 5.3±1.5, head-trauma/haemorrhage 11/6]. VAP was diagnosed by positive microbiological culture (bronchoalveolar lavage $>10^4$ CFU/mL). Severe sepsis and septic shock were defined according to Bone (1). Microbiological cultures were negative in all the patients at Intensive Care Unit (ICU) entry, and no other infection than the pulmonary one was detected during ICU stay. Serum concentrations of the proteins were determined using the following methods: WBC (Sysmex/SF–3000, Dasit, RV<11000 mm^3), PCT (Immunoluminometric-assay, Brahms Diagnostica, RV<0.5 ng/mL), CRP (Nephelometric-technique, Dade, RV<5.0 mg/L) and SAA (Latex-enhanced nephelometric-technique, Dade, RV<6.4 mg/dL). The within-run and the between-run precision for the markers determination were as follows: 11.0% and 18.7% for PCT assay, 4.9% and 2.7% for CRP, and 5.0% and 6.6% for SAA, respectively. RESULTS. Modifications in biochemical parameters are shown (mean ± standard deviation) in the Table.

	WBC (mm^3)	PCT (ng/mL)	CRP (mg/L)	SAA (mg/L)
AT ICU ENTRY				
No-VAP (n=17)	13963±7853	0.8±1.1	43.9±36.6	241.3±195.8
VAP No-severe (n=9)	12392±5180	0.8±0.6	67.5±32.6	352.1±185.1
VAP Severe (n=8)	14539±4880	8.8±9.7°#	90.6±74.2*	568.3±682.8
VAP DAY				
VAP No-severe (n=9)	12276±5278	0.8±0.6	51.6±51.1	425.6±313.9
VAP Severe (n=8)	13160±3689	5.4±6.9	74.0±64.1	780.3±464.0

° $p < 0.001$ vs No-VAP (Mann-Whitney Rank Test).
# $p < 0.001$ vs No-severe VAP at entry in ICU (Mann-Whitney Rank Test). *$p < 0.05$ vs No-VAP (Student's t-test).

CONCLUSION. PCT at ICU entry appears to be a sensitive and specific marker to predict VAP severity.
REFERENCE. (1) Bone RC. Crit Care Med 1991;19(7):973-76.

248

GASTROPANEL AS SCREENING OF GASTRIC ATROPHY IN PRIMARY CARE

Germana' B.[1]; Liatopoulou S.; Comparato G.; Moussa A.; Carloni C.; Lecis P.[2]; Bertiato B.[3]; Dogliosi C.[1]; Aragona G.; Cavallaro L.G.; Cavestro G. M.; Iori V.; Merli R.; Bertolini S.; Caruana P. [4]; Biedo F.C.; Basso D.[5]; Plebani M.[5]; Di Mario F.

[1]Gastroenterology Unit, Belluno, Italy; Department of Clinical Sciences, Chair of Gastroenterology, University of Parma, Italy; [2]Laboratory Unit, Belluno, Italy; [3]Pathology Unit, Belluno, Italy; [4]Chair of Pathology, Parma, Italy; [5]Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy.

Background: Histological examination is essential to give information about the topografy of gastric damage. Serum pepsinogens and gastrin-17 were found useful biomarkers in detecting morphologic alterations of gastric mucosa. Aim. to assess by means a non-invasive test (Gastropanel parameters: serum pepsinogen (sPGI) and II (sPGII), PGI/PGII ratio, gastrin-17 levels (G-17) and IgG-anti H. pylori both morphology and function of gastric mucosa in primary care. Patients and Methods: 363 consecutive out-patients (208 F, mean age 50.6, range: 18-88 years) were studied for dyspeptic symptoms.In each subject, blood samples were taken to evaluate IgG anti H. pylori, sPGI, sPGII and gastrin-17 levels (EIA, Biohit, Helsinki, Finland) and upper gastrointestinal endoscopy with biopsy (two antrum, two corpus) was performed. We designed the topography of gastric atrophy as antral predominant (APA, antrum > corpus), diffused (PAN, antrum =corpus) and corpus predominant atrophy (CPA, corpus > antrum). Results: 76 subjects were excluded because taken antisecretory therapy. 132 subjects resulted positive for Hp infection (mean age 52 years, range 19-83) and 155 Hp-ve negative (mean age 48, range 18-88) with respective values (sPGI: 120.69 mcg/L vs 88.8 mcg/L, p <0.001; sPGII: 15.95 vs 8.96, p<0,001; PGI/PGII: 9.63 vs 11.88, p=0,003; Gastrin-17: 8.46 vs 12.91 pmol/L, p=0,354; IgG anti-H. pylori: 79.95 vs 21.12, p<0,001).The statistically significant differences were found: APA vs CPA: p<0.001 for mean sPGI; p=0.002 for mean sPGII; p<0.001 for mean PGI/PGII; p<0.001 for mean gastrin-17; p<0.001 for mean IgG anti-H. pylori PAN vs CPA : p=0.43 for mean sPGI. Conclusion: Gastropanel provides more information about the morpho-functional status of gastric mucosa and the presence of H. pylori related gastritis and could be used as a first approach strategy (test and treat) in primary care to select subject for upper gastrointestinal endoscopy and biopsy identifying gastric precancerous conditions or lesions.

249

SEVERE RESPIRATORY ALLERGY INDUCED BY INDIRECT EXPOSURE TO RABBIT ALLERGENS. A CASE REPORT

Dente B.°, Canonica GW.*, Cilento M.°, D'Amato G.^, Liccardi G.^, Pepe G.°, Passalacqua G.*

°Laboratory of Clinical Pathology San Paolo Hospital, Naples, ^Department of Chest Diseases. Division of Pneumology and Allergology H.S. A.Cardarelli Hospital, Naples, *Allergy & Respiratory Diseases, DIMI, University of Genoa..

Indirect exposure to cat or dog allergens play an important role in IgE-mediated sensitization to these allergens, while no study has been previously published on sensitization to rabbit allergens induced by indirect exposure.
A 18 year old woman has been examined in our Service because severe respiratory symptoms appeared two-three days after introduction of a rabbit at home. Cutaneous and serological evaluation revealed a strong allergic sensitization exclusively to rabbit.
The diameter of the wheal and flare induced by rabbit dander was respectively 7x6 mm and 23x22 mm.
The laboratory evaluation showed that the total IgE levels were 554.0 KU/L, specific IgE antibodies was found only for rabbit urine (80.0 KU/L, class V CAP) and rabbit epithelia (>100 KU/L, class VI CAP).
Patient had never owned and was not in contact with a rabbit but there was an indirect exposition in the workplace to rabbit epithelia carried by clothing of a colleague owner of a rabbit. An inspection at workplace confirmed that several hairs were on the clothes of the patient's colleague.
Our data suggest that the introduction of a rabbit at home triggered allergic respiratory symptoms in a subject already sensitized to rabbit allergens as a consecuence of indirect exposure. This finding confirms that a passive transfer of allergens may induce allergic sensitization also to another common house pet as the rabbit. To reduce the risk of trasmission of rabbit allergens individuals owner of a rabbit should avoid wearing elsewhere the same clothes worn near the animal.
Moreover, before the introduction of a pet at home it is preferable to evaluate by skin prick test and/or RAST in susceptible subjects if there is IgE-mediated sensitization to pet allergens.

Reference.

Prince E., Zacharisen MC., Kurup VP. Anaphylaxis to rabbit : a case report. An. Allergy Asthma Immunology 1998; 81: 272-73.

250

THE BEST CUT-OFF VALUES FOR SERUM PEPSINOGEN II TO DISCRIMINATE A SUCCESS OF ERADICATION THERAPY OF H. PYLORI

Cavallaro L.G.; Moussa A.M.; Caruana P.[1]; Merli R.; Iori V.; Stefani N.; Nouvenne A.; Cavestro G.M.; Dal Bò N.[2]; Pilotto A.[3]; Corrente V.[4]; Leandro G.[5]; Basso D.[6]; Plebani M.[6]; Di Mario F.

Department of Clinical Sciences, Chair of Gastroenterology ,University of Parma, Italy; [1]Chair of Pathology, Parma; [2]Gastroenterology Unit, Treviso; [3]Geriatrics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo; [4]Gastroenterology Unit, Parma; [5]Gastroenterology Unit, Castellana Grotte; [6]Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy.

Objective: Current guidelines recommend also UBT or HpSA to assess Hp eradication. Serum pepsinogen II (sPGII) levels increase during Hp infection. Aim: to determinate the best threshold for sPGII to discriminate H. pylori infection after eradication therapy. Subjects and Methods: 313 consecutive patients (177F, mean age 51, range 18-88 years) referred to our outpatient service for dyspeptic symptoms were studied; 156 pts were Hp+ve and 157 were Hp-ve. Hp status was assessed by means of endoscopy with multiple biopsies. At baseline, in all patients a blood sample was taken to determine sPGII levels. Additionally, sPGII determination was performed in 70/156 Hp+ve patients 4 weeks after completion of the Hp eradication therapy; in 29/70 subjects gastroscopy with biopsies were performed to evaluate histologically the effect of Hp therapy on both gastric activity and inflammation . Results: At baseline Hp+ve subjects showed mean sPGII levels significantly higher than Hp-ve (16.81+- 7.4microg/L vs 8.6 +- 3.7microg/L; $p<0.001$). The sensitivity and the specificity of PGII test to detect Hp infection were respectively 74% and 83%. After successful eradication therapy, sPGII levels significantly decreased from 17.56 +- 7.5 microg/L to 8 +- 2.08 microg/L, $p<0.001$ along with the improvement of activity of gastritis; mean sPGII levels slightly decreased from 18.66 +- 11.3microg/L to 15.6 +- 5.9 microg/L ($p=0.03$) in subjects who still remained Hp+ve after treatment. Conclusions: sPGII levels could be proposed as non invasive test either to the evaluate both Hp eradication and the consequent changes in gastric inflammation.

251

OXIDATIVE STRESS LEVELS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Vassalle C.; Boni C.; Petrozzi L.; Andreassi MG.; Botto N.; Zucchelli GC.

Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Area della Ricerca San Cataldo, Pisa.

Background: It is well known that free radicals contribute to endothelial dysfunction and are involved in the pathogenesis and development of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis.
Design: To provide evidence for enhanced oxidative stress in coronary artery disease (CAD).
Methods: Plasma levels of 8-isoprostane (8-epi$PGF_{2\alpha}$, EIA, Cayman, USA), marker of lipid peroxidation, was measured in 68 subjects (age: 60±12 years, mean±SD). Subjects included 30 healthy control subjects (group I) and 38 patients with angiographically proven CAD (group II). In addition, the total antioxidant power (PAO, colorimetric assay, MED.DIA, Italy) was evaluated in a subgroup (n=40, 12 healthy and 28 CAD patients).
Results: Levels of 8-epi$PGF_{2\alpha}$ resulted 194.2±24.6 and 351.1±30.4 pg/ml in group I and II, respectively ($p=0.0003$). In group II, 8-epi$PGF_{2\alpha}$ levels increased with the number of affected vessels (288.3±44 and 380±38.7 pg/ml for one- and multi-vessel disease, $p=0.0004$ versus control subjects).
PAO values resulted 1925.9±148.2 and 1443±94.1 μmol/l of reducing power in group I and II, respectively ($p=0.008$) and significantly decreased with the number of affected vessels (1572.7±156.6 and 1330.6±108.2 μmol/l, for one- and multi-vessel disease, $p=0.014$ versus control subjects).
Conclusion: These findings indicate that elevated levels of plasma 8-epi$PGF_{2\alpha}$ and reduced antioxidant capacity are associated with the extent and the severity of coronary artery disease, supporting the hypothesis that the evaluation of oxidative stress may represent an additional prognostic predictor in such events and a potential target of future therapeutic interventions.

252

ATTIVITA' OSSIDO-RIDUTTIVA NEI PAZIENTI CON INFEZIONE DA HIV

Caldaroni L. (*), Veccia S.(^), Coppa G.(*), Radi B.(^), Del Prete S.(^), D'Amato G. (^), Silvestri C.(^), Cinti B.(*), Tocchini M.(*), Scalise G.(^)

(*) Laboratorio Analisi – Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti di Ancona"
(^) Clinica delle Malattie Infettive – Università di Ancona

Obiettivi: Dimostrare un'alterazione dell'attività ossido-riduttiva in corso di infezione da HIV, tramite il dosaggio plasmatici di vitamina A, vitamina E, cisteina, omocisteina, zinco, rame ed acido lattico.
Metodi: A) sono stati reclutati tre campioni di soggetti:
1) 10 soggetti sani (6♂ e 8♀), donatori AVIS;
2) 10 soggetti HIV+ con CD4>400 mmc (6♂ e 4♀) mai trattati con antirTetrovirali;
3) 14 soggetti HIV+ con CD4<200 mmc (6♂ e 8♀) in trattamento con HAART comprendente 1 IP e 2 NRTI.
B) i dosaggi sono stati effettuati
1) in cromatografia liquida ad alta risoluzione per vitamina A, E, omocisteina e cisteina;
2) lo zinco tramite spettrofotometria;
3) acido lattico tramite analizzatore di "chimica secca";
4) rame in assorbimento atomico.
C) analisi statistica tramite test non parametrico di Kruskall-Wallis accettando un livello di significatività di 0,05.
Risultati: Confrontando contemporaneamente i tre gruppi, si sono ottenute differenze significative per la vitamina E (P=0,008), acido lattico (P=0,029) e per lo zinco (P=0,012); nel confronto incrociato tra gruppi si è osservata, tra sani e gruppo HIV in trattamento, una significatività per vitamina E (P=0,01), acido lattico (P=0,02) e cisterna (P=0,022), mentre tra sani e HIV+ non trattati una differenza significativa è emersa per vitamina E (P=0,008), acido lattico (P=0,023) e zinco (P=0,03). Nei 2 gruppi di soggetti HIV+, la vitamina A, pur mostrando una media campionaria nei limiti della norma, ha evidenziato una significativa differenza tra questi due gruppi (P=0,05).
Conclusioni: Analizzando i risultati ottenuti, nel confronto tra il gruppo di controllo e i soggetti HIV+ in genere (sia quelli in terapia che non), per quanto riguarda la vitamina E, la cisterna e lo zinco, si può supporre che il loro consumo, correlato ad un aumento anche se modesto dell'acido lattico, possa essere ricondotto esclusivamente allo stato infettivo in atto (viremia HIV > alle 500 copie mmc in tutti i soggetti HIV+ senza terapia ed in 11 su 14 in quelli in terapia HAART) e non alle terapie. I risultati sembrano confermare che in condizioni patologiche c'è una aumentata domanda di antiossidanti e che in assenza di questi si può verificare uno stress ossidativo.

Mansoor MA, et al. Anal. Biochem 1992;200:218-229
Nieremberg D.W, et al: J. Cromatography. 1985; 345:275-284

253

CALENDARIO POLLINICO E LIVELLI DI IGE SPECIFICHE PER ALLERGENI INALANTI IN UNA POPOLAZIONE PEDIATRICA

Carletti M., Di Felice G., Palazzo V., Sica A., Carducci G.

Lab.Analisi Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS Presidio di Palidoro, Fiumicino (RM);

Scopo del lavoro
La maggioranza degli allergeni inalanti ha un andamento stagionale, altri sono perenni. Scopo del lavoro è dimostrare l'eventuale correlazione esistente tra alti livelli sierici di IgE specifiche in pazienti pediatrici, residenti nella zona litoranea a nord di Roma e la concentrazione di allergeni inalanti nella bassa atmosfera.
Materiali e metodi
Si sono presi in considerazione i dati relativi alle IgE specifiche per Olea, parietaria, Lolium, Holcus, Dermatophag.pt e Dermatophag. Far., con cut-off > della terza classe, nel periodo 2003, in bambini di età inferiore a 10 anni, afferenti al nostro laboratorio.
La metodica utilizzata è il test immunoenzimatico quantitativo (CARLA SYSTEM-Radim), che prevede l'espressione dei risultati in classi da 0 a 6.
Risultati e Conclusioni
Le percentuali di positività significative, classe >3, sono state messe in relazione al calendario pollinico.
Gli inalanti perenni, rappresentati dai Dermatophagoydes si mantengono costanti tutto l'anno; la Parietaria si mantiene ad un livello costante da aprile a dicembre, ma con basse percentuali; per le Graminacee si registra un picco nella primavera e in estate; l'Olivo, che è molto diffuso nel territorio preso in considerazione presenta un andamento oscillante durante l'anno, rispetto al calendario pollinico, cosa questa verosimilmente dovuta a richieste diagnostiche non correlabili a sintomatologia clinica.

254

THE RISK OF NSAIDs RELATED GASTRIC DAMAGE ASSESSED BY MEANS OF SUCROSE TEST AND GASTROPROTECTION WITH PANTOPRAZOLE.

Maino M.; Di Mario F.; Maini A.; Mantovani N.[1]; Merli R.; Cavestro G.M.; Leandro G.[2]; Cavallaro L.G.; Corrente V.[3]; Iori V.; Pilotto A.[4]; Franzè A.[3]

Department of Clinical Science, Chair of Gastroenterology, University of Parma, Parma, Italy; [1]Gastroenterology Unit, Mantova Hospital; [2]IRCCS Castellana Grotte; [3]Gastroenterology Unit, Parma Hospital; [4]IRCCS San Giovanni Rotondo.

Background NSAIDs can lead to gastric damage with subsequent increased mucosal permeability which is often clinically silent. Sucrose test is a non invasive and economic method to detect gastric damage. Gastroprotective drugs are often recommended and pantoprazole could be proposed in chronic users. Aim To assess gastric permeability by means of sucrose test both in acute and chronic NSAIDs therapy and to evaluate the efficacy of pantoprazole therapy. Methods 71 (M;F)consecutive patients with chronic NSAIDs therapy (group A: pantoprazole 40 mg daily; group B: without pantoprazole). Sucrose test was performed were recorded at baseline and after 2, 4 and 12 weeks; symptoms were recorded at the same visits. Results Group A (31pts): mean sucrose value=0.11% at baseline and 0.13%, 0.12%, 0.13% after 2, 4 and 12 weeks respectively. Group B (40 pts): mean sucrose value=0.11% at baseline and 0.19%, 0.24%, 0.25% after 2, 4 and 12 weeks respectively (p=0.000); symptomatic patients: mean sucrose value=0.23% at baseline and 0.25% after 2 and 4 weeks; asymptomatic patients: mean sucrose value 0.13% at baseline and 0.20%, 0.21% after 2 and 4 weeks respectively (p=0.000). Conclusions Sucrose test is a good tool for clinical evaluation of NSAIDs induced gastric damage both in acute and chronic therapy, mainly in patients with clinically asymptomatic mucosal damage. Pantoprazole 40 mg daily is effective and well tolerated in chronic users.

255

STRESS OSSIDATIVO, OMOCISTEINA E NEOPTERINA NEL TRAPIANTO RENALE

Novembrino C.[1]; Berardinelli L.[1]; Corvo E.[2]; Lonati S.[2]; Carini M.[1] ; Bamonti F.[2]

Dipartimenti di Scienze Chirurgiche[1] e di Scienze Mediche[2] , Università degli Studi Milano, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano

I pazienti sottoposti a trapianto renale sono a rischio di complicanze cardiovascolari e/o di rigetto del nuovo organo. Diverse sono le concause[(1)]. Nei pazienti uremici, che necessitano di trapianto di rene, è stata dimostrata la presenza di iperomocisteinemia (HHcy). I radicali liberi dell'ossigeno (ROS), mediatori della perossidazione lipidica delle LDL, possono essere, se non controbilanciati da un adeguato sistema di difese antiossidanti (TAS), responsabili dei danni potenziali da riperfusione in seguito a rivascolarizzazione dell'organo. Le cellule del sistema immunitario sono le principali fonti, in un processo infiammatorio, di ROS e di complicazioni che portano al rigetto, evidenziabile in modo predittivo dal marker neopterina (Np).
Uno studio prospettico ha effettuato una valutazione diagnostica dei suddetti indici di rischio (tHcy, metodo immunoenzimatico, Abbott; ROS e TAS, metodi spettrofotometrici, Diacron; Np, metodo ELISA, ICN) su sangue periferico di 27 pazienti consecutivi sottoposti a trapianto di rene (15m/12F, età 11-65 anni, mediana 43), prelevati subito prima del trapianto (T0) e nell'immediato periodo post trapianto a 1, 3, 7 giorni dopo riperfusione del nuovo organo (T1, T2, T3).
Per l'analisi statistica si è utilizzato il test t di Student.
I risultati hanno indicato la presenza di uno stato ossidativo sbilanciato in quasi tutti i riceventi (78%) dovuto ad una concentrazione mediana dei ROS nella norma ma una TAS significativamente ridotta già dal giorno T1. Il 95% dei casi a T0 e l'89% a T3 risultavano iperomocisteinemici e, sebbene si avesse una diminuzione significativa ($p<0.05$ vs T0) già dal primo giorno di trapianto, i livelli di Hcy non normalizzavano. Il dosaggio della Np, indice sensibilissimo per il rischio di rigetto, evidenziava una significativa riduzione della concentrazione ($p<0.005$) rispetto a T0 già dalla prima giornata post-trapianto.
La presenza di una situazione ossidativa sbilanciata in quasi tutti i pazienti era presumibilmente dovuta all'evento di tipo infiammatorio in atto. La diminuzione dell'HHcy documentava in positivo la ripresa dell'attività renale conseguente all'impianto del nuovo organo come pure il netto calo della concentrazione della Np era indicativo del buon andamento generale e, soprattutto, dell'assenza di rigetto.
Dal nostro studio emerge l'importanza di utilizzare, nell'ottica della prevenzione del rischio cardiovascolare e/o del rigetto, nuovi aggiuntivi indici diagnostici che meglio possano orientare il clinico.

(1) Cristol J et al. Transplantation (1998); 65:1322-28

256

ALTERAZIONE DELL'EQUILIBRIO OSSIDATIVO COME POTENZIALE MARCATORE PRECOCE DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER

Novembrino C. [1]; Guidi I.[2]; Lonati S.[3]; Galimberti D.[2]; Scarpini E.[2]; Bamonti F.[3]

Dipartimento di Scienze Chirurgiche[1], di Scienze Neurologiche, Centro Dino Ferrari [2] e di Scienze Mediche[3], Università degli Studi di Milano, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano

Diversi studi suggeriscono la presenza di un alterato equilibrio ossidativo nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD) [(1)] e di protezione dall'invecchiamento cerebrale da parte di antiossidanti. Pochi dati sono noti sulle modificazioni dello stato ossidativo in pazienti con demenza vascolare (VaD) e nulla è riportato sul danno ossidativo in pazienti con deficit cognitivo lieve (MCI). Allo scopo di verificare la presenza di fattori di rischio per lo sviluppo di AD ed, in particolare, l'esistenza di marcatori predittivi di conversione da MCI in AD, sono stati selezionati 134 pazienti (44 M/90 F, età media 75±10 anni) tra quelli afferenti all'Unità Valutativa Alzheimer dell'Ospedale Maggiore di Milano, sulla base delle seguenti diagnosi: 25 AD possibile, 34 AD probabile, 22 VaD, 26 MCI e 27 soggetti, esenti da patologie neurologiche, da considerarsi controlli. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con insufficienza d'organo, deficit nutrizionali, bassi livelli di vitamine e folati e quelli supplementati con vitamine o antiossidanti. Ogni gruppo risultava omogeneo per età e sesso. Sono stati determinati su plasma i livelli di omocisteina (tHcy; metodo immunoenzimatico IMx Abbott) e su siero quelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS, metodo spettrofotometrico, Diacron), i metaboliti reattivi dell'ossido nitrico (NO_x, metodo colorimetrico) e la capacità antiossidante totale (TAS, metodo spettrofotometrico, Diacron); è stato determinato anche il genotipo ApoE (metodo RFLP), noto fattore di rischio per lo sviluppo della AD. L'analisi statistica è stata effettuata con il metodo ANOVA.

I risultati hanno indicato una TAS significativamente più bassa ($p<0.05$) nei pazienti AD possibile e probabile (384±53µmolHClO/mL) ed in quelli MCI (377±73µmolHClO/mL) rispetto ai soggetti considerati controlli (437±73µmolHClO/mL), ma invariata nei pazienti VaD (411±60µmolHClO/mL). Non è stata evidenziata alcuna differenza delle concentrazioni di ROS e di NO_x fra i gruppi considerati mentre sono stati riscontrati valori significativamente più elevati ($p<0.05$) di tHcy solo nei pazienti AD (21±10µmol/L) e VaD (24±18µmol/L) rispetto ai controlli (14±6µmol/l). Nessuna correlazione si è evidenziata tra i vari parametri studiati.

La presenza di ridotta TAS, ed il conseguente sbilanciamento dell'equilibrio ossidativo, nei pazienti AD ed in quelli MCI suggeriscono la possibilità che lo stress ossidativo giochi un ruolo specifico nella patogenesi dell'AD e quindi possa essere un potenziale marcatore per la diagnosi precoce di AD .

[(1)] Teunisse CE et al. Neurobiol Aging (2002); 23: 485-508

257

FAILURE OF HELICOBACTER PYLORI ERADICATION THERAPY: A COMPARISON OF DIFFERENT RISK FACTORS (LABORATORY VERSUS ENVIRONMENTAL ITEMS)

Liatopoulou S.; Moussa A. M.; Cavallaro L. G.; Merli R.; Iori V.; Aragona G.; Cavestro G.M.; Marcucci F.[1]; Dal Bò N.[2]; Pilotto A.[3]; Franzé A.[1]; Basso D.[4]; Plebani M.[4]; Di Mario F.

Department of Clinical Sciences, Chair of Gastroenterology, University of Parma, Italy; [1]Gastroenterology Unit, Parma, Italy; [2]Gastroenterology Unit, Treviso, Italy; [3]Geriatric Unit, Casa Sollievo Della Sofferenza, IRCCS, Foggia, Italy; [4] Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy.

Background.The main cause for failure of Helicobacter pylori eradication is rapresented by antibiotic resistance. Recent studies have shown that other factors such as the degree of inflammation, intragastric acidity and smoking habit are associated with H. pylori eradication failure. Aim: To investigate factors influencing unsuccessful eradication by means of histology, environmental factors, serum pepsinogens I (sPGI), II (sPGII) gastrin-17 (G-17) and IgG-H. pylori. Patients and Methods.A series of 72 consecutive H. pylori +ve patients (33F, 39M, mean age 54.7, range 21-81) were enrolled. In 44 patients, an upper gastrointestinal endoscopy with biopsies (two antrum, one incisura, two corpus) scored by the same pathologist according to the Updated Sydney System Classification was performed. By means of a structured interview, smoking habit, coffee and alcohol intake were recordered. In all patients, a blood sample was taken for determination of sPGI, sPGII, G-17 and IgG-H. pylori levels (EIA method, Biohit, Helsinki, Finland). H. pylori eradication schedule was rabeprazole 20 mg bid + tinidazole 500 mg bid + clarythromicin 500 mg bid for 7 days. Control of H. pylori eradication was performed by means of 13UBT 4 weeks after stopping therapy. Results.Fifty-three of 72 (71.6%) patients showed H. pylori eradication. Eradication therapy was unsuccesful in 16/17 (94%) of patients with high density of H. pylori at corpus than patients with absent or low colonies of H. pylori (14/27; 51.9%) ($p < 0.004$). No statistically significant difference was found with regard to coffee, alcohol, smoke intake and the levels of sPGI ($p = 0.15$), sPGII ($p = 0.07$), G-17 ($p = 0.26$) and IgG-H. pylori ($p = 0.57$). Conclusion.These findings suggest that H. pylori eradication therapy is less effective in subjects with high number of H. pylori colonies at corpus level.

258

LE MALATTIE DA PRIONI DELL'UOMO: STUDIO DELLE FORME FAMILIARI

Limido L., Di Fede G., Pasquali C., Suardi S., Rossi G., Giaccone G., Tagliavini F.

Istituto Nazionale Neurologico "C. Besta", Milano

Le malattie da prioni sono encefalopatie degenerative trasmissibili caratterizzate dall'accumulo di forme alterate della proteina prionica. Possono essere genetiche, sporadiche o acquisite. Le forme genetiche comprendono tre fenotipi clinico-patologici - malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), Insonnia Familiare Fatale (FFI) e malattia di Creutzfeldt Jakob (fCJD) - che sono associati a specifiche inserzioni o mutazioni puntiformi del gene della proteina prionica (PRNP). Nel periodo 1994-2003 sono stati diagnosticati 194 casi certi di malattie da prioni, 58 dei quali (29.8%) avevano una origine genetica. I casi affetti da fCJD rappresentavano il 24.2%. Tale percentuale è sensibilmente maggiore dei dati riportati in letteratura, che stimano i casi genetici di CJD pari al 15% circa (Rev Neurol 2001; 157: 6-7, 633-637). In particolare, sono stati riscontrati 9 casi di malattia di GSS associati a mutazione P102L, 1 caso di FFI con mutazione D178N in frame con metionina al sito polimorfico 129 e 47 casi di fCJD. Di questi 24 (51.1%) presentano la mutazione V210I, 15 (31.9%) la mutazione Q200K, 5 l'inserzione di 1 octarepeat, 2 di 4 octarepeat e 1 di 8 octarepeat. Dei 47 casi di fCJD solo 9 avevano una storia familiare positiva per la malattia. I nostri dati suggeriscono che, in Italia, un quarto dei casi con encefalopatia da prioni ha una origine genetica e la maggior parte delle forme genetiche di fCJD ha bassa penetranza.

259

RELATIONSHIP BETWEEN SERUM PEPSINOGENS AND DIFFERENT FEATURES OF H. PYLORI CHRONIC GASTRITIS

Cavallaro L.G.; Moussa A.M.; Merli R.; Bertolini S.; Dal Bo' N.; Rugge M.; Franze' A.; Basso D.; Plebani M.; Di Mario F.;

Background: H. pylori chronic gastritis has a key role to develop severe gastro-duodenal diseases. The evaluation of this condition by means of serum pepsinogens is important for the first management of dyspeptic patients but it imposes an optimal comprehension of the factors influencing pepsinogens excretion. Aim: To study the relationship between serum pepsinogens and different histopathological features of H. pylori related chronic gastritis. Patients and Methods: 149 consecutive outpatients referred for dyspeptic symptoms were studied. All patients underwent endoscopy with biopsies. Serum pepsinogens I and II were measured by immunoassay method. Results: Serum pepsinogens levels were significantly correlated with H. pylori density both of the corpus and antrum as well as with chronic inflammation and activity in the antrum. Only sPGII was correlated with chronic inflammation and activity in the corpus. SPGI was inversely correlated with atrophy and intestinal metaplasia in the corpus. Conclusions: Serum pepsinogens I and II are linked to the gastric histopathological features in different ways. Serum pepsinogen II levels could be considered as markers of gastric inflammation all over in the stomach. Serum pepsinogen I levels are related to antral inflammation and atrophic body gastritis.

260

SERUM PEPSINOGEN II AND ORAL SUCROSE TEST IN THE ASSESSMENT OF GASTRITIS IN PEDIATRICS

Moussa A.M.; Cavallaro L.G.; Merli R.; Cavestro G.M.; De Angelis G.L.[1]; Maffini V.[1]; Bizzari B.[1]; Caruana P.[2]; Basso D.[3]; Plebani M.[3]; Di Mario F.

Department of Clinical Sciences, Chair of Gastroenterology, University of Parma, Italy; [1]Pediatrics Department, University of Parma, Italy; [2]Chair of Pathology, University of Parma, Italy; [3]Department of Laboratory Medicine, Hospital of Padova, Italy.

Objectives: Non-invasive methods could be considered ideal tools in pediatric patients in order to detect H. pylori infection. Serum pepsinogen II (sPGII) seems to be correlated with H. pylori related gastritis.
Aim: to assess the morphological status of gastric mucosa and the presence of H. pylori infection by means of three non-invasive methods: blood test for sPGII levels and antibodies anti-H.pylori (IgG-Hp), and urinary sucrose excretion. Methods: forty five children with dyspeptic symptoms were analyzed. All children were submitted to upper gastrointestinal endoscopy with biopsies. Serum sample were analyzed for IgG-Hp and sPGII levels. Oral sucrose test using 20 mg in 10 ml of water was performed in 25 children. Results: Eighteen resulted H. pylori positive children with histological findings of mild or moderate antral active chronic gastritis, showed mean value of sPGII levels significantly higher and sPGI/sPGII ratio significantly lower than negative children. The best cut-off of sPGII levels to detect Hp related chronic gastritis resulted 9.7; with 66% of sensitivity , 92% specificity, PPV 86%, 80% NPV and 82% of accuracy. A combination of sPGII with IgG-Hp can detect Hp related gastritis with a sensitivity of 93%, specificity 92%, PPV, 88% and NPV 89%. No statistically significant differences were found in the urinary sucrose excretion between colonized and not Hp colonized children. Conclusions: A panel test of sPGII and IgG-Hp could be proposed as a non invasive method to assess histological alterations of gastric mucosa related to Hp infection in children.

261

RELATIONSHIPS BETWEEN SERUM NEOPTERIN AND PLASMA THIOLS LEVELS IN HEALTHY SUBJECTS

Sotgia S.; Zinellu A.; Usai M.F.; Carru C.; Deiana L..

Chair of Clinical Biochemistry – University of Sassari

We have recently described a new simple HPLC method with highly sensitive fluorimetric detection to measure neopterin (NP) in serum (1). Neopterin measurement in healthy subjects was employed to investigate on its potential relationship with plasma thiols levels including cysteine, homocysteine, glutathione, cysteinylglycine and glutamylcysteine. In fact, also homocysteine (HCY), like neopterin, was claimed as an independent risk factor for atherotrombotic disease. Some authors have already demonstrated a positive correlation between NP and HCY, whereas, so far no investigation was performed on the relationships with other physiological thiols. Blood samples from 35 healthy volunteers were collected by venipuncture, and immediately centrifuged, at 3000 x g for 10 min at 4 °C, for the plasma and serum separation. For the neopterin analysis 100 µl of TCA (5%) were added to 100 µl of standard or serum sample and vortexed for 10 sec. The samples were centrifuged at 3000 g for 5 min. 50 µl of supernatant was diluted with 200 µl of bidistilled water and 30 µl aliquot was used for HPLC analysis. Plasma thiols were measured by capillary electrophoresis laser induced detection (CE-LIF) as described by Zinellu et al.(2). Plasma thiols and serum neopterin concentrations were compared. As described by other authors, we found a positive correlation between HCY and NP ($r=0.36$; $p=0.03$). Moreover we also described, for the first time, a closely relationship between Cys and NP levels ($r=0.44$; $p=0.01$), while no relationship was observed with the other thiols. Although less reactive than homocysteine, cysteine shares some of the chemical properties derived from the presence of the sulfhydryl group. Cysteine has a general cytotoxicity in vitro and promotes detachment of human arterial endothelial cells in culture. It also exhibits auto oxidation properties in presence of metal ions, resulting in the development of free radicals and hydrogen peroxide that promote the activation of the cellular immune system by the enhanced induction of NF_kB and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). These findings imply that homocysteine and cysteine might act synergistically compromising vascular functions by interference with endothelial and leukocyte function.

1. C. Carru et al. Biomed. Chrom., 2004 in press
2. A. Zinellu et al. Electrophoresis, 2003, 24, 2796-2804

262

PREVALENCE OF COELIAC DISEASE IN THE PARENTS OF PRETERM AND SMALL FOR DATE NEWBORN INFANTS.

Barassi[1] A.; Finazzi[2] S.; Salvatore[3] S.; Re[2] G.; Curcillo[2] M.; Mutti[2] S.; Lotzniker[2] M.; Melzi d'Eril[1] GV and PremaCel Study Group[4].

[1]DSBSC, Università dell'Insubria, Varese. [2]A.O. Ospedale Civile di Legnano, Milano. [3]Clinica Pediatrica, Università dell'Insubria, Varaese. [4]Pat. Neonatale, Ospedali Lombardi, Lombardia.

INTRODUCTION. Untreated coeliac disease may adversely affect the reproductive system at different ages and reproductive disorders may be the first symptoms of this disease. It is still uncertain whether unrecognized coeliac disease is a risk factor of preterm delivery. The role of paternal coeliac disease is even more controversial. The premature and low birth weight infants have a greater risk of developmental disabilities such as hypoxic ischemic encephalopathy, periventricular leukomalacia, seizures, and intraventricular haemorrhages associated with neuromotor and cognitive deficits. Moreover, these infants can present respiratory, cardiac and growth problems, blindness, deafness and less severe handicaps such as learning disabilities and language and attention deficits.The aim of this study is to determine the prevalence of coeliac disease in both parents of preterm or small for date newborn infants. METHODS. Since May 2003 we have consecutively enrolled 675 (337 females and 338 males) parents of preterm (<37th week) or small for date (<10th percentile) newborns in thirteen different neonatal centers (PremaCel Group) of Northern Italy. Serum IgA recombinant anti-human transglutaminase (tTG) concentrations were determined in all subjects (Eu-tTG IgA umana, Eurospital). The intra-assay CV for the IgA human-tTG autoantibody ELISA was 2.2% (n=30), and the inter-assay CV was 5.8% (n=30). We considered as pathological the values >7 UA/mL. Total serum IgA were also measured by immunoturbidimetric assay (Tina-Quant IgA, Roche) on the Hitachi 917 in all the parents. Serum levels below 0.05 g/L revealed selective IgA deficiency. No exclusion criteria were applied. RESULTS. One mother and two fathers of three different babies showed pathological concentration of transglutaminase; this result was confirmed by serum IgA anti-endomysial antibodies determined by indirect immunofluorescence method on monkey esophagus (INOVA Diagnostics). Out of the 675 parents, only two showed serum IgA deficiency. The prevalence of coeliac disease in the parents involved in our study was 1:225, which is similar to the prevalence in the Italian adult population. CONCLUSION. Our preliminary data do not show an increased prevalence of coeliac disease in parents of preterm or small for date newborn infants compared to reported Italian population. REFERENCE. Volta U. et al. High prevalence of celiac disease in Italian general population. Dig Dis Sciences 2001;46(7):1500-1505.

263

MONITORING OF MONOCYTE FUNCTIONAL STATE DURING CARDIAC SURGERY WITH CPB

Parri M.S., Sbrana S., De Filippis R., Gianetti J., Clerico A.

Institute of Clinical Phisiology CNR-CREAS, "G. Pasquinucci" Hospital, Via Aurelia Sud, Massa (MS).

Background: Cardiac surgery with CPB induces post-operative complications depending on prolonged activation of the cellular components of immune system. In particular monocytes may be responsible for morbidity associated with CPB.
Aim of the study: To evaluate monocytes functional state during and after open heart surgery with CPB, using flow cytometry procedures.
Methods: Blood samples from 14 patients were drawn either from peripheral (before operation, 4 and 24 hours after CPB) or coronary vein (before and after cardioplegia). The following phenotypic and functional parameters were evaluated with the employment of monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes direct against either membrane or intracellular molecules: surface expression of integrin molecules (CD18, CD11a, CD11b), CD15 cluster complex (Lewis antigen), HLA-DR (MHC class II molecule); intracellular myeloperoxidase (MPO) content and intracellular cytokine production (IL-6, IL-1β and IL-8).
Results: We observed a down modulation of surface molecule expression (RFI, relative fluorescence intensity) on peripheral monocytes at 24 hours after CPB: CD18 (from 529±11 to 502±10, p=0.0003), CD11a (from 615±8 to591±8, p=0.0237), CD11b (from625±14 to599±17, p=0.031), CD15 (from 40.69±8.54 to 22.54±6.98, p=0.0026) and HLA-DR (from 376±19 to 244±19, p<0.0001). A decreased of MPO content was evident on peripheral blood monocytes at 24 hours after CPB (from 204±15 to 173±18, p=0.011) and in coronary blood monocytes after postischemic reperfusion (from 269±14 to 214±25, p=0.0162). At 24 hours after CPB was also observed a decrease of the percentage of cytokine producing cells if compared with basal measurement: IL-6 (from 48.7±8.3 to 23.9±5.3, p=0.0063), IL-1β (from 74.9±6.1 to 57.4±5.9, p=ns) and IL-8 (from 74.8±5.7 to 55.7±5.1, p=0.029).
Conclusions: The down modulation of integrins and adhesive receptor expression and the loss of MPO suggest a strong activation of circulating monocyte after CPB, further exacerbated by contact with coronary ischemic vessels. The reduced proinflammatory cytokine production, observed at 24 hours after CPB, suggests a functional polarization of circulating monocyte.
Reference: Tárnok A, Bocsi J, Rössler H, Schylow V, Schneider P, Hambsch J. Low degree of activation of circulating neutrophils determined by flow cytometry during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Cytometry 2001; 46: 41-49.

264

EVALUATION OF THYROID FUNCTION IN CABG PATIENTS: A SIX MONTHS FOLLOW-UP STUDY

Parri M.S., Cerillo A.G., Giannelli I., Fontani G., Glauber M., Clerico A., Storti S.

CNR Clinical Physiology Institute
"Ospedale G. Pasquinucci", Massa, Italy

Objective The nonthyroidal illness syndrome (NTIS), characterised by low triiodothyronine (T3) levels, is usually considered to be a transient and completely reversible phenomenon in patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) surgery. However, no previous studies, to the best of our knowledge, have documented the time-course of recovery of euthyroidism after CABG surgery. The aim of this study was to assess the recovery of normal thyroid function in patients six months after uncomplicated CABG.
Methods. Thyroid profile was evaluated in 22 consecutive patients (aged 66 ± 9.7 years - mean ± standard deviation, 18/4 male/female) undergoing CABG. Exclusion criteria were: known thyroid disease, thyroid hormones abnormalities at admission, assumption of drugs known to interfere with thyroid function. Blood samples, in SST tubes, immediately centrifuged and frozen at -20°C until the analysis, were obtained at six time points: (i. e., at admission, at 0, 12, 48 and 120 hours after surgery, and at the 6 months follow-up visit). T3, free T3 (FT3), free thyroxine (FT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) were assayed by AxSYM® Microparticles Enzyme ImmunoAssay (Abbott Laboratories); T4 and total serum thyroid hormone binding capacity (T-uptake) were measured on the same samples by AxSYM® fluorescence polarization immunoassay (Abbott laboratories). The Free Thyroid Index was also calculated from T4 and T-uptake according to the following equation: FTI=T4/T-uptake.
Results. A typical NTIS was observed in all patients. In particular, the mean FT3 concentration was reduced to about 80% of the basal value at the end of surgery; it dropped further 12 hours after surgery and was still reduced in postoperative day 5; this variation was statistically significant ($p<0.0001$ by ANOVA for repeated measures). At a six months follow-up visit, all patients were free from cardiac symptoms. Thyroid function was normal in 18 patients (81.81%), while one patient developed overt hypothyroidism. In another patient NTIS persisted (low T3 and FT3 levels with normal TSH), and finally other 2 patients showed moderate hyperthyroidism (increased FT3 levels with suppressed TSH).
Conclusion. Thyroid profile returns to normal values in most (more than 80%) uncomplicated CABG patients 6 months after surgery. However some significant thyroid function alterations were evidenced in 4 out of 22 patients. Further studies are needed to define the long term consequences of the postoperative NTIS on thyroid function.

Klemperer JD. Thyroid hormone and cardiac surgery. Thyroid 2002;12:517-521

265

CLINICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF NEOADJUVANT TOREMIFENE IN OLDER WOMEN WITH PRIMARY BREAST CANCER

Martinetti A., Seregni E., Ferrari L., Cappelletti V., Celio L., Daidone MG., Pallotti F., Perrone B., Bombardieri E., Bajetta E.

Nuclear Medicine Unit, Medical Oncology Unit B, Department of Experimental Oncology, Istituto Nazionale Tumori, Milano, Italy

Background: Endocrine therapy is effective in downstaging patients (pts) with primary breast cancer (BC) and may be considered in elderly women. Toremifene (TOR) is a triphenylethylene selective estrogen receptor modulator. **Aim:** A two-step, sequential phase II study was conducted to investigate the clinical and biological efficacy of TOR (60 mg/day) as a short-term pre-operative therapy (3 months) in elderly pts with newly diagnosed, oestrogen receptor positive (ER+) operable or locally advanced (T2-T4b, N0-1) BC. **Methods**: BC diagnosis was established by clinical examination, mammography and core-needle biopsy. A cut-off of 10% of stained cells was used to define ER positivity. At baseline and after 3 months of treatment, tumour size was estimated clinically (by calipers). All pts were monthly examined for tumour measurements during treatment. After 3 months of TOR, all pts were referred to the breast surgeon. Blood samples were collected at baseline and monthly for 3 months. Endocrinological profile (gonadotrophins, oestradiol and testosterone), bone metabolism (BAP and ICTP) and tumour markers (Ca15.3 and c-erbB-2-neu) were evaluated on serum samples with IRMA, RIA or ELISA methods. Also the relationship between intratumour levels of ERα/β mRNA and objective responses was investigated. **Results**: Forty-seven evaluable pts entered the study. The median age was 78 years (range, 65-90); the median value of clinical tumour diameter was 3.0 cm (range, 2.1-6.0). The majority of pts (72%) were classified as T2 without clinical nodal involvement. By WHO criteria, we observed 20 tumour regressions (4 CR+16 PR), 25 stabilizations and 2 progressions. Among the 25 pts with stabilizations, 14 achieved an initial reduction in tumour size (decrease ≥25% in the product of the largest diameters), while disease in 11 was truly static. Gonadotrophin baseline median levels (range) were 29.4 mIU/ml (9.7 – 67.3) and 73.3 mIU/ml (12.9 – 145) for LH and FSH respectively. After 3 months of TOR LH and FSH levels decreased to 23.3 (4.8 – 52.8) and 51.7 (13.9 – 100) respectively. In 38 assessable pts, a correlation between the intratumour ERα but not ERβ mRNA levels, and objective regression was observed. **Conclusions**: This study indicates that, over a minimum period of 3 months, pre-operative TOR therapy can induce a worthwhile response rate in elderly women with early ER+ BC. Bone metabolism and tumour markers evaluation are still in progress.

266

LIVELLI DI 25-OH-VITAMINA D IN DONNE BIANCHE E DI COLORE E RELATIVI NEONATI AFFERENTI ALL' A.S.L 11 DI VERCELLI

Patrucco G.,Guarino R.*,Guala A.*

S.O.C. Laboratorio Analisi osp. S.Andrea Vercelli
*S.O.C. Pediatria osp. SS. Antonio e Biagio Borgosesia

La pigmentazione della pelle, usi culturali ed esposizione al sole influenzano i livelli di vitamina D3. Recenti linee guida raccomandano supplementi di vit. D ai lattanti alimentati con solo latte materno. Ad alto rischio per rachitismo sono bambini di madri di colore , bambini poco esposti a luce solare e prematuri. Scopo dell'indagine biennale(ristretta ai mesi invernali) è di dosare i livelli di vit.D in 4 gruppi di 12 individui costituiti da mamme bianche/loro neonati e mamme di colore/loro neonati per valutare il miglioramento dei livelli dopo un anno di somministrazione di vitamina. E' stato messo a punto in HPLC (Lachrom L7100 Hitachi) un metodo di dosaggio con kit della ditta ChromSystems. Per i due gruppi di colore(madri/ figli) i valori di vit.D sono di molto inferiori al range di normalità dimostrando la necessità di assumere vit.D in gravidanza e alla nascita.
Wharton B.,Bishop N.The Lancet 2003;362:1389-1398

267

CONFRONTO TRA DUE METODI PER IL DOSAGGIO DELLA CICLOSPORINA A: CASISTICA SU PAZIENTI RECENTEMENTE TRAPIANTATI E IN TERAPIA DI MANTENIMENTO AI TEMPI T0 E T2

Ciuti R., Luceri F., Zanazzi M.°, Messeri G.

Laboratorio Centrale d i Analisi Biochimico - Cliniche,
°U.O. di Nefrologia, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze

Scopo del lavoro: questo studio si è proposto di effettuare un confronto nella determinazione della Ciclosporina A (CsA) tra una metodica applicata al sistema analitico TDx (Abbott) ed un metodo applicato ad un analizzatore Dimension RxL (Dade-Behring).
Materiali e metodi : sono stati raccolti 80 campioni ematici di pazienti trapiantati renali e sono stati suddivisi in due gruppi: trapiantati da meno di un anno (gruppo I) e trapiantati da più di un anno in terapia di mantenimento (gruppo II). A ciascun paziente sono stati prelevati due campioni, uno di base (T0) e uno dopo 2 ore (T2), il cui monitoraggio mostra la maggiore efficacia clinica in quanto è il prelievo che meglio correla con l'area sotto la curva concentrazione/tempo -AUC- da 0 a 4 ore successive alla somministrazione. I campioni con valori di CsA > 1200 ng/ml per il sistema TDx e CsA > 800 ng/ml per il sistema RxL sono stati riprocessati previa diluizione 1:3 con standard zero.
Risultati: sotto sono riportati i risultati ottenuti sulla popolazione di trapiantati da meno di un anno (p calcolata con t Student per dati appaiati, ns = non significativo):

	T0			T2		
	media	d.s.	p	media	d.s.	p
TDx (ng/ml)	253	84		1119	119	
RxL (ng/ml)	197	76	<0.0001	1150	234	n.s.

I risultati ottenuti su di una popolazione di trapiantati da più di 1 anno sono i seguenti

	T0			T2		
	media	d.s.	p	media	d.s.	p
TDx (ng/ml)	178	77		783	236	
RxL (ng/ml)	145	92	<0.0001	806	260	n.s.

Le rette di regressione ed i rispettivi coefficienti di correlazione sono:
I gruppo T0 RxL= 0.82 TDx – 11.1 r=0.920
T2 RxL= 1.02TDx + 8.42 r=0.831
II gruppo T0 RxL= 1.12TDx - 55.4 r=0.939
T2 RxL= 0.96TDx + 25.2 r=0.954
Conclusioni: dai risultati ottenuti è emerso che:
a) il sistema TDx, essendo meno specifico per il parent-drug, fornisce livelli più alti nei valori basali (circa + 22% per il I gruppo e + 18.5% per il II gruppo);
b) nei valori di picco (T2), allorché la metabolizzazione è di scarsa entità, i due sistemi correlano perfettamente;
c) i due sistemi sono più correlati nei pazienti in terapia di mantenimento, probabilmente a causa di una minore metabolizzazione del parent-drug.
La nostra valutazione conclusiva è che il sistema RxL rappresenta una valida alternativa al sistema TDx ed inoltre ha l'indubbio vantaggio di non richiedere un pre-trattamento manuale del campione.
Bibliografia: Morris R.G. Ther Drug Monit, 2000; 22(2):160-162

268

VALUTAZIONE DI UN METODO ENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'OMOCISTEINA TOTALE

Cancellieri E., Grassini A., De Bernardis M., Arsola L., Montanelli A.

Dipartimento di Patologia clinica – Ospedale Maggiore di Crema (CR)

Introduzione: Per quantificare l'omocisteina totale sono stati descritti diversi metodi che comportano l'uso di tecniche RIA, cromatografiche ed immunometriche. Recentemente è stato reso disponibile un kit commerciale, che utilizza un metodo enzimatico. Scopo del presente studio è di esprimere una valutazione sia in merito alle performance analitiche che al grado di correlazione con il metodo in chemiluminescenza routinariamente in uso nel nostro laboratorio.
Materiali e metodi: Il kit (CAROLINA Liquid Chemistries Corp.) che si fonda sull'applicazione di un metodo enzimatico è stato utilizzato con procedura automatizzata sullo strumento di chimica clinica AEROSET (ditta ABBOTT). La concentrazione dell'omocisteina totale è direttamente proporzionale al delta di assorbanza tra NADH e NAD nella reazione finale che vede il Piruvato trasformato in Lattato per opera della LDH. La lettura viene eseguita fotometricamente a 340nm alla temperatura di 37 °C. Il range dei valori di riferimento è compreso tra 0 – 16 mcmol/L. La precisione analitica del metodo è stata testata dosando, in cinque sedute, 2 sieri di controllo (basso ed alto) per un totale di N° 50 determinazioni. La linearità è stata verificata sottoponendo un campione con valori elevati di omocisteina (98mcmol/L) a diluizioni scalari. La correlazione è stata elaborata verso il metodo in chemiluminescenza applicato allo strumento CENTAUR (ditta BAYER). Allo scopo sono stati utilizzati N° 31 campioni di plasma, anticoagulati con EDTA, raccolti in modo random e congelati, dopo separazione, a –20°C. Le determinazioni sono state acquisite in tre sedute analitiche dopo verifica sulle strumentazioni delle curve di calibrazione e dei rispettivi controlli.
Risultati: Il CV interserie è risultato del 20% per il controllo basso (media analitica 5,94 mcmol/L) e del 7% per quello alto (media analitica 23,06 mcmol/L).
La curva di linearità si è dimostrata ottimale per concentrazioni di analita da 3 mcmol/L fino a 100mcmol/L.
La correlazione tra i due metodi si è dimostrata più che soddisfacente (y = 0,9641x +1,955 R2 = 0,9537).
Conclusioni: Il metodo enzimatico preso in esame presenta alcuni vantaggi: determinazione sia su plasma che siero, possibilità di accesso random, buona linearità della curva delle concentrazioni e costi contenuti. Tra gli svantaggi si segnala un elevato CV per valori medio-bassi, valori peraltro ampiamente al di sotto della soglia di significatività clinica dell'analita.
Bibliografia: Pietzsch J, Pixa A. Determination of total homocysteine. Clin Chem 1998; 44:1781-1782.

269

VARIAZIONI APPORTATE AD UNA METODICA HELENA PER ELETTROFORESI DELLE PROTEINE URINARIE.

Tappi A., Iannaccone C., Salvemini L.

I Laboratorio Analisi Azienda Ospedale-Universita' Foggia

SCOPO Il kit REP/SPIFE è proposto dalla Helena per la separazione e quantificazione delle proteine urinarie mediante elettroforesi su gel di agarosio su strumenti automatici.
Le proteinurie di tipo glomerulare, tubulare e misto possono così essere facilmente distinte e caratterizzate, fornendo utili informazioni sulle funzioni specifiche del nefrone. Inoltre l'elettroforesi urinaria è importante nel
follow up delle gammapatie monoclonali e soprattutto nella ricerca dei mielomi, che producono un eccesso di immunoglobuline la cui escrezione giornaliera è spesso proporzionale al numero di plasmacellule neoplastiche.
La introduzione nel laboratorio della metodica in automatico è stata accolta con favore, ma immediatamente si è evidenziata la difficoltà di lettura densitometrica delle bande ottenute , dal momento che con la metodica raccomandata si ottenevano bande eccessivamente lunghe. Al fine di ottenere i risultati previsti abbiamo dovuto effettuare variazioni ad alcune fasi della metodica.
METODI Kit Helena REP/SPIFE. Camera di migrazione, colorazione e densitometro Helena.
Campioni di urina fresca provenienti da reparti diversi e quindi con presenza di varie patologie e varie concentrazioni di proteine.
RISULTATI E' stato molto indaginoso arrivare ad un risultato valido, dal momento che per la bassa concentrazioni delle proteine il rischio di apportare variabili tali da inficiare il risultato era forte.
La decisione di utilizzare un modo diverso di deposizione del campione, sempre in automatico, ma con l'utilizzo di barre di deposizione invece di puntali in maniera da avere deposizioni nette con incisioni nel gel, e la modificazione del volume di campione applicato da 3 ul a 2 ul ha portato ai risultati sperati.
Le bande elettroforetiche si sono mostrate adeguate e lette al densitometro non hanno creato problemi, dando dei tracciati simili all'elettroforesi delle proteine plasmatiche, perfettamente interpretabili.
BIBLIOGRAFIA
Heinemann H. : Proteinuria. Am J. Med. 56:71-82 1974
Watts N. Clin. Chem. , 37: 2027,1991

270

A NEW FERRITIN ASSAY ON THE OLYMPUS AU 2700.

Signò P.; Barassi A.; Bisci E.; Melzi d'Eril GV.

Hospital of Circolo, Univ. of Insubria, Varese.

INTRODUCTION. High concentrations of ferritin, an iron-storing protein, are present in human liver and spleen. Small amounts are also found in serum. Precise measurement in the lower range is required in the diagnosis of iron deficiency anemia; a wide analytical range is useful in tumors and inflammation. METHODS. We present the preliminary data about the evaluation of a latex-enhanced turbidimetric immunoassay (FER-Latex(X2)CN "SEIKEN") on Olympus AU 2700. This is a new assay which might have a good sensitivity at low levels and, at the same time, a wide measuring range. We also studied the distribution of ferritin concentration in healthy people and in iron deficiency anemia patients. The assessment of the assay performance included linearity test, analytical sensitivity, imprecision tests, verification of the traceability to WHO standard and comparison to the nephelometric system Beckman Immage (Beckman Coulter). We used plasma (k_2EDTA) samples taken from laboratory routine, Immuno-Q-sera II "SEIKEN" controls and Beckman Coulter Calibrator for ferritin (80/578 WHO standard). RESULTS. Linearity test, performed using high ferritin level samples and the respective diluted samples, that covered the analytical range (0 - 1000 ng/mL), was evaluated by linear regression analysis (slope = 0.988, r = 0.99 , medium bias = -2.77%). Assay sensitivity (2 SDs of the zero calibrator, n = 21) was less than 3 ng/mL. Imprecision tests were performed using 3 plasma pools. The between-run CV was 2.74% (n = 21, mean = 31 ng/mL), 1.62% (n = 21, mean = 227 ng/mL) and 2.14% (n = 21, mean = 981 ng/mL). The within-run CV was 2.06% (n = 21, mean = 30 ng/mL), 0.44% (n = 21, mean = 222 ng/mL) and 1.39% (n = 21, mean = 961 ng/mL). The recovery of controls was 98.4% (n = 15, target value = 108 ng/mL) and 99.5% (n = 15, target value = 420 ng/mL). The traceability to WHO standard, using Beckman Coulter Calibrator for ferritin (200 ng/mL), showed CV 0.89% and recovery 102.6%. The comparison with the nephelometric system Beckman Immage gave the following regression analysis: SEIKEN = 1.039 Immage + 9.8, r = 0.99. The distribution of ferritin concentrations in healthy males was found significantly higher than in healthy females (mean 120 vs 56 ng/mL). No important difference between genders was found in iron deficiency anemia patients. CONCLUSIONS. The preliminary data seem to demonstrate the good quality of the new assay. The FER-Latex(X2)CN "SEIKEN" assay is sensitive, precise and accurate. An analytical sensitivity < 3 ng/mL and a precision of CV always < 3% make the assay suitable for use in the diagnosis of iron deficiency anemia. The wide measuring range is useful in tumors and inflammation. REFERENCE. Hollis S. Ann Clin Biochem 1996;33:1-4.

271

VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DI DUE ANALIZZATORI MULTIPARAMETRICI NELLA MISURA DI DROGHE D'ABUSO E FARMACI

*Poggesi M.; *Rapi S.; §Bellati P.; §Barletta E.; *Ciuti R.; *Ciani S.; *Brogioni M.; *Messeri G.

*Lab. Centrale Analisi (AOU-Careggi. Firenze)
§ Abbott SpA Divisione Diagnostici (Roma)

INTRODUZIONE: nell'ambito di uno studio multi centrico Europeo per la valutazione delle prestazioni dell' analizzatore automatico per chimica clinica Architect c8000 (ABBOTT) sono state effettuate prove relativamente ad alcuni farmaci e droghe d'abuso. SCOPO DELLO STUDIO: valutare, secondo linee guida NCCLS, precisione, linearità, e confrontare le prestazioni fornite dai nuovi metodi con un sistema di riferimento. Gli analiti valutati sono stati: digossina (DIG), fenobarbital (PHENO), teofillina (THEO), nel siero e cocaina (COC), cannabinoidi (THC), oppiacei (OPI) ed amfetamine (AMPH) nelle urine. MATERIALI E METODI: la precisione è stata valutata eseguendo 2 serie analitiche/giorno per 5 giorni consecutivi (NCCLS EP5-A), per complessive 20 determinazioni, su campioni di controllo a 4 livelli di concentrazione per tutti gli analiti, eccetto che per gli oppiacei per i quali sono stati valutati 3 livelli. La linearità dei metodi (NCCLS EP6), è stata effettuata, solo per i farmaci, su diluizioni seriali di campioni a concentrazione elevata dell'analita. Come metodo di riferimento per il confronto tra metodi (NCCLS EP9-A) è stato scelto il sistema attualmente in uso, Dimension Rxl (DADE-BEHRING). Le prove di confronto fra Architect c8000 e Dimension sono state condotte su campioni di urina umana. Per entrambi i sistemi sono stati utilizzati valori di cut-off di concentrazione secondo le linee-guida della SAMHSA (Substance Abuse Mental Health Services Administration). RISULTATI. L'imprecisione (CV%) inter-dosaggio su quattro livelli diversi di concentrazione esaminati per ciascun farmaco risulta (minimo-massimo): DIG: 1.6%-4.9%, PHENO: 6.1%-6.9%, THEO: 4.7%-4.9%. Per le droghe d'abuso, i CV% ottenuti sono: COC (4 livelli): 2.3%-4.6%, THC (4 livelli): 2.6%-11.8%, OPI (3 livelli): 1.82%-2.85%, AMPH (4 livelli): 0.44%-2.56%. Le prove di linearità hanno mostrato un'ottima correlazione fra valore trovato e valore atteso: DIG r=0.999, PHENO r=0.999, THEO r=1.00. Per quanto riguarda il confronto fra metodi (regressione lineare e analisi non parametrica di Bland-Altman), i farmaci esaminati mostrano buona concordanza del metodo in esame con quello attualmente in uso (n, r, slope, intercetta): DIG (113, 0.970, 0.998, 0.085), PHENO (84, 0.980, 0.970, 2.58), THEO (23, 0.990, 0.921, 0.006). La concordanza (positivo/negativo) valutata per le droghe d'abuso risulta del 100% per OPI (N=65), 99.4% per THC (N=162), del 98.5% per COC (N=137) e del 93.3% per AMPH (N=15). CONCLUSIONI. Per la configurazione dei traguardi analitici in tossicologia non ci sono indicazioni univoche in letteratura e come riferimento sono reperibili indicazioni da parte di organi ed autori diversi (Fraser CG, Clin Chem. 1987 Mar;33(3):387-9). Per questi analiti il range di CV "accettabile" risulta molto ampio e pertanto l'imprecisione misurata rientra abbondantemente entro tali limiti.

272

ANALISI DELLA CDT IN ELETTROFORESI CAPILLARE: CONFRONTO TRA METODI.

Trettene M.; Gottardo R.; De Paoli G.; Pascali J.; Bortolotti F.

Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Policlinico GB Rossi, Università di Veona

Sin dalla sua introduzione nel 1976 operata da Stibler e Kjellin, la Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) rappresenta il marker biologico più affidabile per la diagnosi di abuso cronico o ripetuto di alcol. La transferrina è una glicoproteina trasportatrice del ferro, costituita da due catene glucidiche complesse ramificate che presentano un numero variabile di residui di acido sialico (da 0 ad 8) terminale che le conferiscono una carica netta negativa. L'isoforma più abbondante presenta 4 residui di acido sialico (tetrasialo-Tf). La Conseguenza dell'abuso cronico o ripetuto di alcol è rappresentata da un anormale aumento delle isoforme meno glicosilate della Tf (di-, mono- e asialo-Tf), note con l'acronimo di CDT.
I metodi usualmente impiegati per la quantificazione della CDT si basano su immunoassay, isoelettrofocalizzazione o HPLC. Negli ultimi anni si sono inoltre resi disponibili metodiche in elettroforesi capillare (CE).
Scopo del presente lavoro è stato quello di eseguire un confronto in termini di efficienza, risoluzione dei picchi e selettività tra tre metodiche in CE per la separazione delle isoforme della Tf: il metodo da noi sviluppato[1] e due kit commercializzati dalla ditta Analis (Namur, Belgio) sviluppati nel 2001 e nel 2004.
I campioni in analisi erano costituiti da sieri afferenti all'ospedale di S. Bonifacio (VR). Secondo il metodo di riferimento, questi venivano saturati con una soluzione ferrica e dopo diluizione iniettati in CE. Il buffer di corsa era costituito da tetraborato di sodio 100 mM e DAB 1,5mM. Per gli esperimenti con i kit commercializzati i sieri sono stati trattati secondo le indicazioni del produttore. La separazione e l'acquisizione dei dati è stata condotta con un elettroferografo capillare automatizzato con rivelazione UV in-column della ditta Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).
Il confronto eseguito dimostra una scarsa correlazione tra i dati forniti dal metodo di riferimento e dal kit Analis 2001, che presenta problemi relativi all'incompleta separazione tra la disialo-Tf e la trisialo-Tf. Al contrario la nuova formulazione del kit (2004) garantisce una completa risoluzione tra tutte le isoforme separate consentendo una corretta quantificazione della CDT che si
correla con elevata significatività (R=0.9449) con il metodo di riferimento.

Tagliaro F., Crivellente F., Manetto G., Puppi I., Deyl Z., Marigo M., Optimized determination of carbohydra-te deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis; 19:3033-3039; 1998.

273

EVALUATION OF EMIT® 2000 TACROLIMUS ASSAY ON THE V-TWIN VITALAB ANALYZER.

Signò P.; Barassi A.; Frattini M.; Melzi d'Eril GV.

Hospital of Circolo, Univ. of Insubria, Varese.

INTRODUCTION. Tacrolimus is a potent macrolide immunosuppressive agent that has been used as a primary immunosuppressant for the prevention of allograft rejection (1). This drug is a calcineurin inhibitor that causes the blockade of T-cell receptor-stimulated transcription of interleukin-2. The aim of this study is to assess the Emit® 2000 Tacrolimus Assay using V-Twin Analyzer (Dade Behring). We compared the data of the V-Twin Analyzer with those obtained by the same assay on the Vitalab Viva Analyzer (Dade Behring), a well experienced instrument. Performance evaluation included within- and between-run imprecision, linearity test, analytical sensitivity, assessment of potential interferences and calibration stability. METHODS. The Emit assay is an immunoassay technique, based on the competition for antibody binding sites between tacrolimus in the sample and tacrolimus in the Enzyme Reagent. The V-Twin Vitalab is a new "open" chemistry analyzer, with eight different available wavelengths. RESULTS. Within- and between-run imprecision was evaluated by analyzing three levels of control (Tac/Csa control, More Diagnostics) in 20 replicates. The results were satisfactory (medium within-run CV 7.3%; medium between-run CV 7.8%). Linearity test, performed using high tacrolimus-level samples and the respective diluted samples, which covered the analytical range (0-30 ng/mL), showed $0.93 < r < 0.97$ and $1.01 < \text{slope} < 1.07$. The samples were prepared by diluting high tacrolimus pool with the negative whole-blood calibrator. Analytical sensitivity (0.6 ng/mL) was evaluated, from 5 separately calibrated runs, by measuring 20 replicates of the zero calibrator. The effect of interference from bilirubin (25 mg/dL), uric acid (20 mg/dL), tryglycerides (800 mg/dL) and cyclosporine (400 ng/mL) was studied. No important interference was found (error < 10%). We measured tacrolimus concentration in duplicate in 100 EDTA whole-blood samples, collected in kidney transplant recipients, using the same Emit assay on the two different analyzers. Comparison data were evaluated by linear regression and Pearson's correlation coefficient ($r = 0.95$, intercept = 0.4, slope = 0.96). The new system can process about 80 samples in 60 min, with the first result available in 13 min; the old system could process only 40 samples. Calibration stability was evaluated by analyzing 3 levels of control and 3 whole-blood samples at one week's intervals, with a calibration curve generated on day 0: calibration curve was stable for one month. The system range is 0-30 ng/mL. Samples exceeding this level may be diluted with either the zero calibrator or negative EDTA whole blood. CONCLUSIONS. In general, the Emit 2000 Tacrolimus Assay confirmed its good analytical performance on the new V-Twin Vitalab Analyzer, associated to a reduction in timing. REFERENCE. (1) Spencer CM. Drugs 1997;54:925-75.

274

PREPARATORE DI MICROPIASTRE EIA E VETRINI IFI "BIO-RAD PhD™ SYSTEM": VALUTAZIONE ED ESPERIENZE.

Colombi R., Novarini P., Bianchi P.

AO della provincia di Pavia, Dip. di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi PO di Stradella, STRADELLA (PV)

Da diciotto mesi è in funzione presso il nostro laboratorio lo strumento "PH-D System" prodotto e commercializzato da Bio-Rad Laboratories Srl (Segrate, Milano). E' un sistema robotizzato modulare per la preparazione e la lettura di micropiastre EIA, nonchè, piu' recentemente e sulla medesima piattaforma, di vetrini IFI, così composto: PC di governo, interfacciabile a LIS; lettore di micropiastre; da una a dieci stazioni preparatrici, ciascuna delle quali può allestire 2 micropiastre (192 test) con la possibilità di programmare le metodiche a livello del singolo pozzetto, oppure 20 vetrini (fino a un massimo 240 test). Il sistema è aperto e totalmente programmabile dall'utente.
La stazione preparatrice presenta un pipettatore robotizzato su tre assi che con due aghi affiancati esegue tutte le funzioni di aspirazione, erogazione, lavaggio e diluizione. La pompa campionatrice può trattare riproducibilmente volumi a partire da 1 µL, potendo così realizzare direttamente nel pozzetto della micropiastra le diluizioni finali delle metodiche EIA, risparmiando la prediluizione in provetta intermedia, con economie di tempo e di spazio.
In un test volto a stimare l'imprecisione di diluizione di un campione, si diluivano microvolumi crescenti (1, 3, 8, 10 µL) di $K_2Cr_2O_7$ concentrato con quantità costanti di tampone. Nelle quattro serie di 12 replicati cadauno, il CV% era del 3.1%, 1.0%, 0.8% e 1,1% rispettivamente.
In un test di dispensazione con volumi di 50, 100, 200 e 300 µL, l'imprecisione risultava dell' 1.8%, 1.1%, 0.6% e 1.2% rispettivamente.
Il lettore opera a 405, 450, 550 e 620 nm. Sono disponibili numerosi modelli matematici per il trattamento delle curve di calibrazione.
Nel caso di allestimento di vetrini per immunofluorescenza, la cui geometria può essere liberamente disegnata dall'utente, risulta particolarmente comoda la possibilità di decidere liberamente per ogni "pozzetto" l'identità del campione e la diluizione a cui allestirlo. Piani di lavoro grafici, riproducenti il vetrino che si sta leggendo al microscopio, aiutano a registrare correttamente i risultati senza possibilità di errore. La qualità dei vetrini IFI allestiti è costantemente paragonabile a quella ottenibile da un tecnico qualificato in buona giornata.
Gli autori hanno riscontrato una operatività del tutto soddisfacente e apprezzato la flessibilità di programmazione, la completezza del software e le ottime prestazioni di pipettaggio e lettura.

275

AUTOMATED MULTIANALYTE TESTING FOR DRUGS OF ABUSE USING RANDOX'S PROTEIN BIOCHIP ARRAY TECHNOLOGY SYSTEM - EVIDENCE®

Bonucci A.F.[1], Orsulak P.J. [2], Fuller D.C. [2], Akers L.C. [3], Fitzgerald S.P. [4], Lamont J. [4], McConnell I. [4]
[1]Randox Italy, Via Casale Ferranti 35/C, 00173 Roma, [2]University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, [3]VA North Texas Health Care System, Dallas, TX and [4]Randox Laboratories, Crumlin, Co. Antrim, Northern Ireland, UK

The aim of this study was to assess the overall performance of drugs of abuse screening using Evidence® automated immunoassay platform and to compare the results with an alternative immunoassay system, CEDIA (Microgenics) and GC/MS. Some 1,350 neat clinical urine samples were analysed for the following drugs (with cut-offs); benzodiazepines (200ng/ml), barbiturates (200ng/ml), cannabinoids (50ng/ml), opiates (300ng/ml), amphetamine (1000ng/ml), cocaine (300ng/ml), methamphetamine (1000ng/ml), methadone (300ng/ml) and PCP (25ng/ml). Samples were selected to ensure they covered the full range of results for all assays with 10% of samples falling within 25% of the cut-off concentration. Percentage agreement values were calculated as the number of sample results classified as either positive or negative (at the relevant cut-off value). Results from the study demonstrated excellent agreement between the Evidence® and CEDIA® assays with 93-99% correlation, depending on the assay. Evidence® however compared more favourably to GC-MS, (83-99% agreement) than CEDIA® (60-97%) and reduced the number of false positives when confirmed by GC-MS. In conclusion, the Evidence® system enabled rapid and accurate simultaneous measurement of drugs of abuse in clinical samples and provided an increased throughput of 1,350 tests/hour. This method offers substantial cost savings for screening clinical samples for drugs of abuse where it reduces false positive tests that ultimately need to be confirmed by GC-MS.

276

VALUTAZIONE DI UN NUOVO KIT PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-ACTINA F

Munegato G., Alessio M.G., Carminati V.,Crippa M.*, Amboni P..,Benedetti T., Ferri N, Maestroni C, Pagani S., Radaelli A., Ottomano C.

Laboratorio Analisi , Ospedali Riuniti ,Bergamo e *Laboratorio Analisi,Policlinico Ponte San Pietro, Ponte San Pietro, Bergamo

L'Epatite Autoimmune (AIH) è una malattia ad andamento cronico,caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi, ipergammaglobulinemia, quadro istologico di infiltrato mononucleare nello spazio portale e risposta elettiva al trattamento con cortocosteroidi.
L' AIH di tipo 1 (AIH 1) colpisce prevalentemente individui giovani di sesso femmminile ed è caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti nucleo (ANA) e/o anticorpi anti muscolo liscio (ASMA) . Questi ultimi costituisco una classe di anticorpi eterogenei, diretti contro diverse componenti del citoscheletro (actina, tubulina,filamenti intermedi) e possono comparire in numerose situazioni cliniche, come infezioni virali, epatiti ,mononucleosi e nel 3-18 % di individui sani. Nell'AIH di tipo 1 solo gli ASMA con specificità per l' actina F sembrano essere caratteristici della patologia , sia ai fini diagnostici che prognostici, rappresentando un fattore negativo sia per la risposta alla terapia corticosteroidea che per l'evoluzione verso grave insufficienza epatica e cirrosi.
Gli ASMA vengono usualmente rilevati su sezioni di stomaco/fegato di topo o di ratto, con tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI) , di cui sono ben noti i limiti intrinseci .
Abbiamo voluto determinare sensibilità e specificità.di un nuovo kit per la determinazione immunoenzimatica degli anticorpi anti- actina F (QUANTA Lite Actin ELISA, INOVA, San Diego, California). Abbiamo testato il kit su sei gruppi di campioni: **1.** 50 donatori sani **2.** 33 soggetti con patologie virali epatiche acute **3**. 33 soggetti con epatite cronica attiva **4.** 18 soggetti con epatite cronica e crioglobulinemia **5.** 32 soggetti con malattie autoimmuni epatiche non AIH 1 **6.** 20 soggetti con AIH tipo 1, confermata biopticamente.
Risultati : utilizzando il cut-off indicato dalla ditta produttrice (20 U) , la media dei valori del gruppo dei pazienti con AIH 1 (57.79 ,range 6.8-165) è risultata statisticamente significativa rispetto a tutti i gruppi di controllo (rispettivamente, 6.7,range 2.5-12 ; 10.8, range 4.7-26.4 ; 13.3, range 3.8-33.9 ; 10.0, range 2-30.8 e 11.9 ,range 3.6-33.7, $p < 0.0001$ per tutti i gruppi, T test e Mann Whitney U test). Il CV intraserie è risultato pari a 5,8%, quello tra le serie dell' 8%.
La sensibilità del test è risultata essere del 75%, la specificità del 93 %.
Anche se il numero di pazienti con AIH tipo 1 testati è stato limitato, il kit per la ricerca degli anticorpi anti actina ha mostrato ottime performance , che andranno confermate su una casistica più ampia.

277

VALUTAZIONE DELL'ANALIZZATORE DI CHIMICA CLINICA KONELAB 20i

Cavalcanti E, Bevilacqua N.*, Figoni O., Pinto P., Romano V., Scognamiglio A., Dente B.

U.O.C. di Medicina di Laboratorio, P.O. San Paolo, ASL 1 Napoli, * Laboratorio di Patologia Clinica, A.O.R.N. Cardarelli , Napoli.

E' stato valutato, secondo le raccomandazioni dell'European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) (1), l'analizzatore di Chimica Clinica Konelab 20i (Dasit). Sono state studiate le sue performances analitiche nel dosaggio di alcune proteine specifiche (ASO, RF, PCR, Transferrina, Catene □ e □, Recettore solubile della Transferrina) e dell'HbA1C.
Tutti i reagenti utilizzati sono distribuiti da Dasit per l'utilizzo esclusivo su analizzatori Konelab.

Imprecisione nella serie: sono stati analizzati: siero di controllo per proteine (Immunocontrol 1, Dasit); siero di controllo specifico per HbA1C (HbA1C Control abnormal,); siero di controllo specifico per il Recettore solubile della Transferrina (IdeA STfR it control H); un pool di sieri umani. Ciascun materiale è stato analizzato per tre giorni consecutivi in serie di 20 replicati. I CV ottenuti non erano mai superiori al 3% salvo che per ASO (CV= 5% per controllo e pool) e per RF (CV=5% solo sul pool).

Imprecisione tra le serie: è stata valutata come CV% ottenuto analizzando i sieri di controllo ed il pool, in duplicato, per 20 giorni. In questo caso i CV non superavano il 5% circa. Si sottolinea che per RF il CV era 3.1% per il materiale di controllo e raggiungeva un valore di 5.7% nel pool (probabilmente in relazione alla criticità della conservazione dei campioni per l'analita).

Il confronto dei dosaggi eseguiti su 70 sieri di pazienti sia sul Konelab 20i che sul nefelometro Immage (Beckman) ha fornito ottime correlazioni per tutti gli analiti in esame tranne che per RF. Per la PCR si è eseguita una correlazione anche con i risultati forniti da Integra 700 (Roche); anche in questo caso si è riscontrata un'ottima correlazione fra gli analizzatori.
In conclusione il sistema Konelab 20i risulta affidabile e ben correlato con i sistemi analitici in uso presso il nostro laboratorio ed inoltre le sue caratteristiche lo rendono idoneo all'impiego in piccoli laboratori o come strumento di back-up in laboratori di medie dimensioni.

Bibliografia: European Committe for Clinical Laboratory Standards: Guidelines for the evaluation of analyters in clinical chemistry,3rd. Draft.Berlin:Beuth Verlag GmbH, ECCLS document. Vol 3,n. 2, 1986.

278

VALUTAZIONE DEL CAMPIONE EMOLISATO E SUA ACCETTABILITA'

Bassi L., Comelini L., Rizzardi S.

Azienda Istituti Ospitalieri, Laboratorio analisi, Cremona

SCOPO

L'emolisi è tra le cause più frequenti di non conformità (N.C.) preanalitica. Nel nostro laboratorio nel 2° trimestre 2003 su un totale di 2123 N.C. 1315 erano legate al prelievo e di queste 417(32%) dovute ad emolisi. Scopo del lavoro è stato valutare come gestire in modo non soggettivo un campione emolisato, per standardizzarne l'accettabilità e la refertazione.

MATERIALI E METODI

Sono stati valutati in modo standardizzato, tramite lettura multifotometrica, gli Indici del siero con sistema Modular P/P Roche su 100 campioni interni emolisati per valutarne l'eventuale interferenza sui seguenti analiti:

PT,AST,ALT,GGT,CK,LDH,Na,K,ALP,TG, BILT,Fe

E' stato poi richiesto al reparto di ripetere il prelievo e sono stati ridosati i medesimi analiti. I risultati ottenuti sono stati inizialmente confrontati con i range di accettabilità forniti da Roche, poi con i risultati analitici ottenuti sui 2 prelievi del paziente.

Analita	H<100	H 100/ 200	H>200	H>350	Δ	indice roche
TP	A	A	A	A	=	>650
AST	A	A	NA	NA	↑	NA
K	A	NA	NA	NA	↑	NA
LDH	A*	NA	NA	NA	↑	NA
Fe	A	NA	NA	NA	↑	>80
GGT	A	A	A	NA	↓	>200

A/A* = accettato/ accettato con riserva

NA= non accettato

CONCLUSIONI

La nostra valutazione sui 100 campioni ha permesso di refertarne il 98% di cui il 50% dei campioni è stato refertato in modo completo, il 36% con commento di lieve emolisi e il 20% con mancata refertazione solo degli analiti maggiormente sensibili all'emolisi e solo il 2% è stato annullato. Il confronto con i valori di accettabilità forniti dalla tabella Roche in alcuni casi non concordava completamente con i nostri risultati che ci permettevano una maggiore elasticità. Questa valutazione ha messo in evidenza come emolisi visivamente evidenti potevano essere accettate anche per analiti quali il ferro, il potassio o AST, solo LDH mostrava una maggiore sensibilità verso l'emolisi e quindi è un analita da refertare solo in presenza di prelievo corretto.

279

CONFRONTO FRA DUE METODI DI MISURA DEI LIPIDI IDROPEROSSIDI NEL PLASMA

Giovannini F*; Masini A*; Torri C**; Trenti T***

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, **Callegari SpA, Catellani Group, Parma, ***Servizio di Patologia Clinica, Ospedale di Pavullo nel Frignano, Modena

Lo stress ossidativo, compresa la perossidazione lipidica, è coinvolto in numerose condizioni patologiche nell'uomo. Vi sono diversi metodi analitici utili alla determinazione degli idroperossidi, prodotti intermedi della lipoperossidazione, nei campioni biologici. Alcuni di questi tuttavia mancano di specificità adeguata, non distinguendo gli idroperossidi dagli alcoli, altri invece sono di particolare difficoltà metodologica, necessitando di strumentazione analitica complessa e operatori particolarmente addestrati. Scopo della presente ricerca è quello di valutare la sensibilità e specificità di un metodo spettrofotometrico rapido e semplice, denominato FORM System (Callegari SpA, Catellani Group, Parma). Questo metodo è basato sulla capacità dei metalli di transizione (Fe^{++}/Fe^{+++}) di catalizzare la reazione di formazione di radicali liberi dagli idroperossidi. Questi radicali reagiscono con un derivato della p-fenilendiammina formando un composto colorato con un massimo di assorbimento a 505 nm. Allo scopo di validare questo sistema di misura, sono stati messi a confronto i risultati ottenuti con questo metodo e con una metodica di riferimento in HPLC (1). La linearità dei due metodi si è dimostrata eccellente in un range da 1 a 100 μM utilizzando come standard sia idroperossidi organici (cumene idroperossido) che naturali (HPODE, idroperossido dell'acido octadecadienoico). Prove di recupero eseguite su campioni di plasma addizionati di quantità note di cumene idroperossido hanno evidenziato un ottimo recupero per entrambi i metodi dell'ordine di oltre il 90%. Il CV intranalitico si è dimostrato accettabile per queste determinazione essendo inferiore al 10%. Il coefficiente di correlazione si è rivelato essere superiore a 0.80, valore accettabile considerando la diversa metodologia analitica e la diversità della matrice: ovvero nel caso del FORM System la misura diretta sul plasma, nel caso dell'HPLC, la misura sull'estratto di lipidi plasmatici. Ulteriori ricerche sono in atto per valutare il potere discriminante del test nelle varie condizioni patologiche rispetto alla condizione di normalità.

(1) Tokumaru A et al. Anal Chim Acta 1995; 307: 97-102

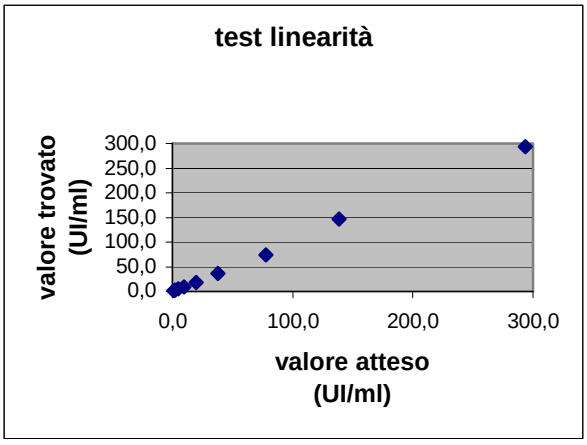
280

VALUTAZIONE DEL METODO ANTI-DSDNA SU ANALIZZATORE AUTOMATICO DSX ™ (DINEX TECHNOLOGY).

Centonze G., Genco R., Petrelli MC., Maggiolini P., Tampoia M., Fontana A., Pansini N.

Patologia Clinica I, Policlinico di Bari

Scopo del lavoro. Valutazione tecnico-strumentale di un kit di immunoenzimatica per la determinazione degli autoanticorpi anti-dsDNA (DIASTAT ™ della ditta AXIS-SHIELD) su analizzatore automatico DSX ™ (Dinex Technology). **Materiali e metodi.** I cinque calibratori a concentrazioni note (da 0 UI/ml a 300 UI/ml) di anticorpi anti-dsDNA pronti all'uso ed a matrice umana (forniti dalla ditta AXIS-SHIELD), sono stati utilizzati per eseguire il test di recupero e di linearità, calcolare la sensibilità analitica e la imprecisione intraserie. **Risultati.** I risultati del test di recupero, espressi come percentuali di recupero, su tre diversi livelli di concentrazione anticorpale hanno evidenziato un valore medio del 95% (R^2 =0,999). I risultati ottenuti dal test di diluizione, anch'essi espressi come percentuali di recupero per ogni concentrazione, riportati in grafico mediante retta di regressione lineare (R^2 =0.999) hanno evidenziato una sensibilità analitica pari a 2,2 UI/ml di concentrazione.



La imprecisione intraserie determinata su due calibratori ha dato un CV di 6,68% sul calibratore 3 (concentrazione media 46,23 UI/ml) e di 5,72% sul calibratore 5 (concentrazione media 278,38 UI/ml). **Conclusioni.**
I dati ottenuti nel nostro laboratorio riguardo l'accuratezza e la sensibilità analitica del metodo (test di recupero e diluizione), hanno confermato quelli riportati dalla ditta produttrice del kit, dimostrando la buona affidabilità analitica del kit, ma soprattutto la corretta applicazione della metodica e delle procedure strumentali nel singolo laboratorio. **Bibliografia**.
Halbert SP. Et al. Studies on autoantibodies to deoxjribonucleic acid and deoxjribonucleoprotein with enzjme immunoassay (Elisa). J Lab Clin Med 1981:97;97-111

281

UN METODO ENZIMATICO PER IL DOSAGGIO DELL'OMOCISTEINA

Malatesti V., Bellucci P., Mori M.

Struttura Complessa Laboratorio Analisi E.O. "Ospedali Galliera" Genova.

SCOPO DEL LAVORO: L'iperomocisteinemia (1) è considerata fattore di rischio per malattie cardio - vascolari e trombotiche nell'uomo (v.n.< 15µmol/L) e nella donna (v.n.< 13µmol/L). Lo scopo del nostro lavoro è la valutazione di un metodo enzimatico su Olympus AU-2700 e su Olympus AU-5400.
MATERIALI E METODI: Il principio del metodo si basa sulla proporzionalità tra la quota di NADH convertito a NAD quando il piruvato, formato dalla scissione della L-cistationina ad omocisteina, è ridotto a lattato. È stato valutato il kit Carolina Enzymic Hcy con calibratore (lotto J03046A) con studi di sensibilità, linearità, imprecisione e confrontato con il metodo FPIA IMX-Abbot, eseguendo l'analisi in doppio su 139 campioni di plasma citrato provenienti dal centro prelievi del nostro ospedale. L'analisi statistica si è basata sulla regressione lineare, la comparazione descrittiva, la correlazione di Pearson ed il t-test. La precisione intra-serie del test è stata valutata analizzando nello stesso giorno 20 replicati di un campione; per la precisione inter-serie si sono analizzati 20 volte tre diversi livelli di controllo Mas Liquimmune basso, medio, alto (lotto LIG0508-1-2-3). La linearità è stata studiata con 10 diluizioni scalari del 10% di uno stesso campione a concentrazione nota.
RISULTATI: Lo studio dell'imprecisione, tra le serie e nella serie, ha evidenziato bassi CV% (tra 0,1 e 0,2); lo studio della linearità dimostra, nell'intervallo tra 2 e 80 µmol/L,una varianza non significativa ed una linearità significativa (p<0,001). La regressione lineare evidenzia un buon coefficiente di correlazione (r =0,998) nel confronto tra metodi; l'equazione è risultata Olympus= 0,953-0,066 Abbot. La sensibilità analitica del metodo è di 0,3. La distribuzione dei valori di omocisteina, ottenuti con le due metodiche, ed il T-test evidenziano una differenza non significativa tra i due metodi.
CONCLUSIONI: La performance analitica del dosaggio enzimatico su Olympus rende il test idoneo alla valutazione dell'omocisteinemia basale e dopo carico di metionina. La linearità sino a 80µmol/L permette una limitata ripetizione del test; in caso di valori elevati la diluizione avviene in automatico dallo strumento. Il metodo consente un flusso di lavoro semplificato ed un miglioramento dell'attività routinaria. Il significativo abbattimento dei costi determina un aumento di efficienza del singolo settore; ne consegue un aumento di produttività con un breve tempo di risposta (TAT 30'). La possibilità di eseguire in modo automatizzato, sullo stesso campione di siero, ulteriori esami per valutare il rischio cardiovascolare (LDL-C, PCR) rende la metodica adatta ad essere inserita in un algoritmo diagnostico per lo studio della patologia cardiaca.
(1) Impaired Homocisteyne Metabolism - Durand P. Lab.Inv. Vol. 81/5

282

VALUTAZIONE PRELIMINARE DEL NUOVO COAGULOMETRO ACL-TOP

Stefanin C., Cozzi M.G., Duca M.L., Garghetti E., Rampinini F., Morelli B.

Laboratorio di Ematologia, Ospedale Civile di Legnano, Milano.

Scopo. Valutare il coagulometro ACL-TOP (IL) utilizzando il protocollo raccomandato dalla Commissione Europea per la Standardizzazione dei Laboratori Clinici (ECCLS).
Materiali e Metodi. La valutazione è stata condotta sui seguenti test: tempo di protrombina (PT), tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), fibrinogeno (Fib), antitrombina (AT), D-Dimero (D-D).
Per ciascun tests sono state valutate l'imprecisione intraserie e tra la serie, il carry-over tra campioni e tra reagenti e la correlazione tra i dati forniti dal coagulometro in valutazione e quelli forniti dal coagulometro ACL FUTURA (IL). Per il Fibrinogeno (dosato secondo il metodo Clauss) ed il D-Dimero è stata valutata anche la linearità. La correlazione analitica è stata eseguita su un numero di campioni compreso tra 150 (AT e D-D) e 350 circa (PT e aPTT) sia con l'analisi di regressione lineare sia con il metodo statistico di Bland-Altman. Tra i campioni analizzati, circa la metà presentavano valori normali, circa un quarto valori lievemente patologici ed un quarto valori gravemente patologici, così da coprire l'intero range analitico.
Risultati. Sia l'analisi statistica di Bland-Altman, sia l'analisi di regressione lineare hanno evidenziato un'ottima correlazione dei dati per PT (r=0,994), aPTT (r=0,997), AT (r=0,986) e D-D (r=0,989). Sono stati ottenuti buoni risultati di precisione intraserie (CV massimi: 2,3% per test coagulativi, 4,1% per AT e 6,3% per D-D), e tra serie (CV massimi: 3,1% per test coagulativi, 5,9% per AT e 8,2% per D-D). Non è stato riscontrato carry-over nè tra campioni nè tra reagenti e, considerando accettabile un bias del ± 10% tra il valore ottenuto ed il valore teorico, il limite di linearità è risultato compreso tra 70 e 740 mg/dL per il Fibrinogeno Clauss e tra 80 e 1050 ng/mL per il D-Dimero.
Conclusioni. Nel complesso lo strumento ACL-TOP, oltre ad alcune interessanti innovazioni tecnologiche, ha evidenziato elevata affidabilità analitica e strumentale, associata ad una notevole facilità d'utilizzo e rapidità di esecuzione che lo rendono idoneo per l'impiego in un laboratorio con elevati carichi di lavoro e nei laboratori specialistici.

Bibliografia: European Committee for Clinical Laboratory Standards. Guidelines for the evaluation of analyzers in clinical chemistry, 3rd draft. Berlin: Beuth Verlag GmbH ECCLS document 1986; 3: 2.

283

CONFRONTO FRA METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE IN FASE OMOGENEA DI COLESTEROLO HDL

Ghiara F; Perrone MC

Laboratorio Analisi ASL 3 Genovese - Polo Levante – Nervi

La determinazione del Colesterolo HDL nel plasma è comunemente utilizzata nella pratica clinica per individuare i pazienti a rischio di patologie coronariche. L'introduzione nel 1996 di dosaggi del colesterolo HDL in fase omogenea ha permesso di applicare i dosaggi su apparecchiature automatiche, migliorando la qualità analitica ed operazionale.
Scopo del presente lavoro è confrontare i risultati ottenuti con un metodo omogeneo di seconda generazione con quelli di altri due metodi di terza generazione, allo scopo di rendere questi ultimi intercambiabili fra loro ed evitare inconvenienti verificatisi per difficoltà di approvvigionamento dei kit, dovute a problemi di certificazione del prodotto.
La concentrazione di colesterolo HDL è stata misurata su 125 campioni di siero di pazienti ambulatoriali utilizzando i seguenti metodi:
1) N-geneous ® HDL (Genzyme)– metodo di seconda generazione
2) Homogenous HDL Colesterol (Alifax)- reagente liofilizzato- metodo di terza generazione
3) Liquid Homogeoeous HDL-c reagent (Alifax) – reagente liquido – metodo di terza generazione
Le determinazioni sono state eseguite sull'apparecchio automatico CX5 (Beckman Coulter)
Tutti i kit provati sono costituiti da due reagenti : il primo reagente contiene una mistura di polimeri e polianioni, che complessano le lipoproteine, escluso le particelle HDL, che vengono solubilizzate dal secondo reagente; la concentrazione di HDL del campione viene rilevata mediante una reazione finale colorimetrica.
Il range dei valori ottenuti è risultato da 30 a 155 mg/dL con il metodo 1, da 27 a 114 con il metodo 2 e da 26 115 con il metodo 3.
I coefficienti di variazione intra-serie di tutti e tre i metodi sono risultati inferiori al 5%.
Il metodo 1 ha mostrato di sovrastimare i livelli di colesterolo HDL soprattutto in quei campioni, le cui concentrazioni erano elevate.
Invece i metodi 2 e 3 si sono dimostrati pressoché sovrapponibili.
Le correlazioni fra i metodi sono state studiate mediante la regressione lineare di Passing-Bablok.
La funzione di regressione fra metodo 2 e metodo 3 è risultata x= 7 + 0,857 y.
Questo studio ha dimostrato la possibilità di utilizzare uno o l'altro dei due metodi di terza generazione per la determinazione nel siero di colesterolo HDL.
Warnick GR e coll., Clin Chem 1995; 41: N°10.

284

ROLLER TEST1: UNA NUOVA GENERAZIONE DI ANALIZZATORI PER LA VELOCITA' DI ERITROSEDIMENTAZIONE.

Nicoli M., Modena N., Rizzotti P., Lippa L.

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM Azienda Ospedaliera di Verona.

Scopo: valutare un nuovo autoanalizzatore per la determinazione della Velocità di Eritrosedimentazione (VES) che utilizza la tecnologia della "microfotometria cinetica capillare".
Materiali e Metodi: il TEST1 ROLLER (ALIFAX S. p. A., Padova, Italy) è uno strumento per la determinazione della VES ed è la versione più moderna e tecnologicamente avanzata del modello TEST1 introdotto sul mercato mondiale alla fine degli anni novanta. Esistono due modelli di TEST1 ROLLER: il ROLLER 20, con un campionatore rotante a 20 posizioni e il ROLLER 160 con 8 campionatori rotanti da 20 posizioni con un carico massimo di 160 campioni.
Come per il TEST1, il ROLLER utilizza microvolumi di campione (150uL di sangue raccolto in K_3EDTA) e non necessita di provette dedicate. Possono essere utilizzate tutte le provette vacutainer in commercio per l'esame emocromocitometrico. Il sistema di lettura, termostatato a 37°C, è basato sulla microfotometria cinetica capillare. I miglioramenti tecnologici riguardano prevalentemente il software gestionale. E' stato introdotto il sistema ciclico di autocontrollo, il lavaggio automatico programmabile, il controllo fotometrico dopo ogni lavaggio. La migliore accessibilità alle parti meccaniche permette una facile manutenzione. Per la nostra sperimentazione abbiamo utilizzato un ROLLER 20 ed è stata determinata la VES su 135 pazienti ricoverati presso la nostra struttura ospedaliera confrontando i dati con un autoanalizzatore TEST1 in nostra dotazione.
Risultati: Abbiamo considerato il TEST1 come strumento di riferimento e calcolato per ogni coppia di risultati la retta di regressione il coefficiente di correlazione e l'errore standard y/x ($y = 0.942\ x - 1.182$, $R = 0.97$, $S_{y/x} = 5.27$)
Discussione e Conclusioni: dalla letteratura in materia (1) è stato dimostrato che la correlazione tra il sistema Westergren e TEST1 è molto elevata (R=0.97). Il nostro obbiettivo era di valutare la sovrapponibilità dei dati su strumenti diversi che impiegano la stessa tecnologia di rilevazione. Dai dati statistici si evidenzia che i due strumenti sono ben correlati tra loro. Inoltre nella nostra esperienza il TEST1 ROLLER si è dimostrato di facile accesso per gli operatori, rinnovato nello styling e rispondente agli attuali requisiti di sicurezza. L'esame della VES, con le nuove tecnologie più avanzate, risulta di più semplice esecuzione e di migliore utilizzo clinico, in particolare nelle infezioni e nelle malattie infiammatorie acute e croniche.
Bibliografia: 1. N. de Jonge, I. Sewkaransing, J. Slinger, J.J.M. Rijsdijk. Erytrocite Sedimentation Rate by Test-1 Analyzer. Clin Chem 2000;46:881-882

285

AUTOMAZIONE DELL'ANALISI DEGLI ELEMENTI CORPUSCOLATI DELLE URINE CON SISTEMA IRIS IQ200.

Brunetti M., Pepe A., Di Sante A., Mancinelli N., D'Amario C.

Patologia Clinica, Ospedale S. Liberatore, Atri (TE).

L'esame del sedimento urinario effettuato con microscopia manuale richiede un elevato coinvolgimento del personale tecnico/laureato, è condizionato da molteplici variabili pre-analitiche ed analitiche e dall'inserimento manuale dei risultati, comporta un rischio d'esposizione a pericolo biologico. L'introduzione di sistemi automatici d'analisi potrebbe ottimizzare e standardizzare l'attività lavorativa di questo settore.
Obiettivi. Abbiamo valutato la funzionalità del sistema automatizzato IRIS IQ200 (Instrumentation Laboratory), che utilizza la tecnologia dell'analisi in microscopia ottica a flusso. Con questo sistema, tutti gli elementi corpuscolati del campione d'urina vengono memorizzati come immagini digitali e successivamente classificati / quantificati in dodici categorie di analiti (G.B., G.R., batteri etc.) da parte di una rete neurale. **Metodologia**. Sono stati analizzati 900 campioni di urine nell'arco di 6 giorni, utilizzando in parallelo il sistema IRIS e l'analisi microscopica manuale del sedimento urinario. I dati analitici ottenuti col sistema IRIS erano revisionati, visualizzando su video le foto digitali di tutti gli elementi figurati dei singoli campioni. In questo modo è stata valutata l'efficienza del sistema di riconoscimento automatico di particelle. Una volta revisionati e validati, i dati erano paragonati a quelli ottenuti mediante l'analisi microscopica manuale del sedimento urinario.
Risultati. Gli errori del sistema di riconoscimento automatico di particelle erano inferiori al 3% (in prevalenza cristalli di ossalato e nuclei di cellule epiteliali classificati rispettivamente come emazie e come leucociti). Il confronto fra sistema automatico e sistema manuale non evidenziava differenze statisticamente significative.
Conclusioni. I'IRIS IQ200 è un sistema d'elevata qualità diagnostica ed ottima produttività, che fornisce risultati quantitativi memorizzabili e revisionabili su video. L'automazione completa e la semplificazione della procedura analitica (eseguita su urina nativa, con eliminazione della centrifugazione), consentono di ridurre gli eventuali errori legati alla variabilità pre-analitica ed analitica ed alla trascrizione dei dati. Interessante è l'integrabilità con altri sistemi (collegamento software con i sistemi d'analisi chimico-fisica e con i sistemi informatici di gestione dati / refertazione; collegamento a binario con sistemi d'analisi chimico-fisica per il passaggio automatico dei rack). Un limite dell'IRIS IQ200 è rappresentato dalla cadenza analitica (60 tests/ora), che potrebbe rivelarsi insufficiente per laboratori ad elevato carico di lavoro.
Wargotz E.S. et al.. Am. J. Clin. Pathol. 88 (6): 746-8. 1987

286

VALUTAZIONE DI UN DISPOSITIVO INNOVATIVO PER LA DIAGNOSI ENDOSCOPICA DELL'INFEZIONE DA H. PYLORI E DELLA GASTRITE ATROFICA.

Villani A., Ferillo G., Scutellà M., Tucci A. *, Bucci M.

- Laboratorio Analisi P.O. "G. Vietri" Larino (CB).
- * Unità di Gastroenterologia - Università di Bologna Ospedale Castel San Pietro Terme - Bologna

La gastrite atrofica della mucosa ossintica (GAMO) è (insieme all'H. pylori) un importante fattore di rischio del cancro dello stomaco [1]. La diagnosi di GAMO è comunemente affidata all'esame istologico e ai test sierologici. La sensibilità di queste metodiche non è alta per cui la malattia spesso sfugge alla diagnosi.
Scopi del nostro studio sono stati: 1) valutare la prevalenza della GAMO nella pratica medica; 2) confrontare le metodiche standard di diagnosi della malattia; 3) valutare affidabilità e validità di uno strumento innovativo (Mt 21-42) che, analizzando automaticamente il succo gastrico, permette la diagnosi dell'infezione da H. pylori e della GAMO "durante" l'endoscopia; 4) analizzare i costi.
10 Unità di endoscopia digestiva italiane sono state coinvolte per fornire dati sui pazienti (12.585) sottoposti a gastroscopia nel 2002. Inoltre, uno studio prospettico su 216 pazienti è stato condotto in una di queste Unità, affiancando l'Mt 21-42 all'apparato endoscopico. Test addizionali sono stati effettuati per confrontare i risultati (istologia, dosaggio sierico della gastrina -G-, pepsinogeno -Pep-, Vit.B12, antic. anti-cellule parietali -PCA-, anti-fattore intrinseco -IFA-, anti-Hp, urea breath test -UBT-, ureasi test -UT-).
I risultati sono riportati nelle Tabelle 1, 2, 3 e 4.

Tabella 1	Pazienti studiati	%	% cancro gastrico
Endoscopia Standard	12.585	1.6%	0.8%
Endoscopia con Mt 21-42	216	12%	0.9%

Tabella 2	**Diagnosi di GAMO**						
	Mt 21-42	G	Pep	PCA	IFA	B12	Isto
Sens	95%	42 %	47%	32%	5%	16%	32%
Spec	85%	98 %	99%	94%	100 %	99%	98%

Tabella 3	**Diagnosi di infezione da H. pylori**				
	Mt 21-42	**Ureasi test**	UBT	IgG-Hp	Isto
Sens	97%	79%	91%	87%	94%
Spec	94%	99%	93%	89%	76%

Tabella 4	**Analisi dei costi** (Euro/per paziente)								
Mt 21-42	G	Pep	**PCA**	IFA	**B12**	**Ig Hp**	**UT**	**UBT**	Isto
0.4	12.9	9.2	8.4	14.5	14.5	9.2	5.8	14	46.5

Conclusioni. 1) La GAMO è una condizione patologica fortemente sottostimata; un notevole divario esiste tra prevalenza effettiva e diagnosi effettuata. L'inefficienza diagnostica è confermata dal piccolo "gap" tra percentuale di GAMO (condizione di rischio) e cancro gastrico (rischio concretizzato). 2) I metodi standard di diagnosi della GAMO sono penalizzati da una bassa sensibilità. 3) L'Mt 21-42 è risultato essere uno strumento valido ed affidabile, nonché il metodo più accurato e più economico per la diagnosi delle principali condizioni di rischio neoplastico dello stomaco (GAMO e H. pylori).

1)Uemura N, et al. New Engl J Med 2001; 345:784-789.

287

"MARGHERITE" NEL SEDIMENTO URINARIO: CRISTALLI RARI DI CARBONATO DI….

Baroni S., Fogazzi G.B.(1), Daudon M.(2), Garigali G.(1), Zini G.(3), Giardina B.

Laboratorio di Chimica Clinica, Policlinico A.Gemelli, Università Cattolica, Roma
Divisione di Nefrologia, Ospedale Maggiore, IRCCS, Milano (1)
Laboratoire de Bochimie A, Hôpital Necker, Paris (2)
Laboratorio di Ematologia, Policlinico A.Gemelli, Università Cattolica, Roma (3)

Nel laboratorio di Chimica Clinica del Policlinico Gemelli durante la lettura microscopica delle urine di routine, cristalli dall'aspetto assai atipico sono stati trovati in un sedimento. Erano numerosi, incolori e la loro forma era molto simile a quella delle margherite, con 6-13 "petali" convergenti verso un nucleo centrale rotondo. Avevano piccole dimensioni , diametro da 15 a 37.5 µm (media 28.5 ± 6.7), contorni ben definiti e alla luce polarizzata non mostravano birifrangenza. Erano inoltre presenti nel sedimento solo alcuni sali di fosfato; l'esame chimico era negativo con pH 7.5 e peso specifico 1025, così pure i dosaggi quantitativi. Le urine erano di una signora di 30 anni all'ottava settimana di gravidanza, in terapia con acido folico, solfato di ferro e levotiroxina e con dieta molto ricca di vegetali. Sono stati analizzati successivamente numerosi altri campioni urine della signora, che aveva mantenuto stesse terapia e dieta, senza mai più rivedere le "margherite". Per identificare la natura di questi cristalli abbiamo:
1) ricercato immagini simili in libri e atlanti storici (43 testi dal 1844 al 1960) e moderni (15 testi dal 1974 al 1999),
2) effettuato la spettroscopia all'infrarosso del campione.
Questi cristalli non assomigliavano a nessuna delle immagini riportate sui testi moderni. Nell'atlante di Robin e Verdeil pubblicato nel 1852 sono disegnati cristalli a forma di margherita ritenuti di carbonato di calcio, trovati però nella saliva di cani. Solo Ultzman e Hofmann nel 1871 descrivevano nelle urine cristalli simili a quelli da noi evidenziati, costituiti da una combinazione di creatina e zinco cloruro.
La spettroscopia all'infrarosso effettuata sul residuo di sedimento del primo campione urine della signora, ha identificato le "margherite" come cristalli di carbonato, ma lo spettro era diverso da quello mostrato dai sali di carbonato usualmente presenti nelle urine, a conferma della particolarità di questa cristalluria.
La natura dei sali legati al carbonato nel formare le "margherite" rimane sconosciuta e anche le cause di questa cristalluria restano poco chiare.

Fogazzi GB, Ponticelli C, Ritz E. The urinary sediment. Masson, Milano 2000
Robin C, Verdeil F.. Paris, Baillière, 1853, Atlas, planche V
Ultzman R, Hofmann KB. Wien, Braumuller, 1871, talfen XV, fig.1

288

SPERMIOGRAMMA: VALUTAZIONE DELLE ANOMALIE NEL VARICOCELE

Malatesti V., Usiglio D., Mori M.

Struttura Complessa Laboratorio Analisi E.O. "Ospedali Galliera", Genova.

SCOPO DEL LAVORO: L'incidenza del varicocele, la più frequente causa di ipofertilità e infertilità maschile, si attesta al 20% tra i 15 ed i 45 anni d'età. Lo sviluppo precoce del varicocele determina un danno funzionale ed anatomico, il perdurare del difetto vascolare comporta un'alterazione della struttura testicolare, deficit nella produzione degli spermatozoi e ipofertilità ingravescente fino alla sterilità azoospermica. Lo scopo del nostro lavoro è la valutazione del tipo e l'incidenza delle anomalie, qualitative e quantitative, degli spermatozoi nei pazienti, con diagnosi certa di varicocele, giunti al nostro laboratorio per lo studio dell'infertilità maschile.
MATERIALI E METODI: Si sono effettuate tre conte microscopiche (200x) con camera di Makler a fresco per valutare la concentrazione di ogni campione, delle cellule germinali e per studiare la motilità quantitativa (% di mobili e % d'immobili) e la motilità qualitativa (% di motilità nelle singole classi); tramite conteggio in doppio con emocitometro di Neubauer (400x), dopo fissazione con soluzione immobilizzante, si è confermata la concentrazione. È stato effettuato, con motilità < al 50%, lo studio della vitalità spermatozoaria (Eosina-test); su tutti i campioni si è studiata l'integrità della membrana spermatozoaria (Swelling-test). La morfologia, dopo striscio del liquido seminale e colorazione di Papanicolau modificata, è stata valutata in microscopia ottica (lente ad immersione 1000X) secondo i criteri di Kruger, studiando i singoli difetti, calcolando l'indice di teratozoospermia (TZI) e di deformità spermatozooaria (SDI). Il nostro studio si è svolto, nel semestre luglio–dicembre 2003, estrapolando dai 220 casi afferenti alla Struttura Complessa Laboratorio Analisi, 54 pazienti con diagnosi clinica di varicocele. I valori seminologici sono coerenti con le indicazioni dei manuali WHO (1).
RISULTATI: Il 47% dei pazienti con varicocele risulta normozoospermico, il 63% presenta anormalità di uno o più parametri seminologici: astenozoospermia nel 71,9%, oligozoospermia nel 37% e nel 19,9% dei casi oligoastenozoospermia. Si riscontra un'elevazione delle anomalie morfologiche, teratozoospermia nel 56% dei casi; la prevalenza è a carico delle malformazioni della testa con il 69,8% sul totale delle anomalie.
CONCLUSIONI: Vista l'alta incidenza di oligospermia, astenozoospermia, teratozoospermia e valutata la gravità del danno testicolare, con quadri di ipofertilità ingravescente, si determina la necessità di una esecuzione precoce dello studio seminologico nei pazienti con varicocele. Si evidenzia l'importanza di follow-up, dopo terapia medica o chirurgica, per la valutazione della funzionalità spermatozoaria in vivo (TZI) ed in vitro (SDI), in vista di procedure di procreazione assistita.
(1) Manuale WHO per l'esame del seme umano - 2000

289

LA STARD INIZIATIVE COME STRUMENTO DI CRESCITA CULTURALE PER IL LABORATORISTA

Pezzati P., Fratini A., Bavazzano P.

Laboratorio Sanità Pubblica ASL 10, Firenze

Malgrado vi sia un generale accordo sul fatto che la presenza di un corpus di solide evidenze relative all'utilizzo dei tests diagnostici costituisca il primo passo verso una consapevole e razionale gestione delle scelte cliniche, la realtà operativa sembra non aderire pienamente a tale concetto, secondo quanto denunciato, nel corso del Cochrane Colloquium tenutosi a Roma nel 1999, dal gruppo di lavoro "Cochrane Diagnostic and Screening Test Method". Il gruppo di lavoro ha infatti presentato un progetto (STARD iniziative Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy), su modello di quanto già fatto per le linee guida relative ai trials clinici, a cura della "Consort iniziative" (Consolidated Standards of Reporting Trias www.consort-statement.org), consistente nella revisione delle esistenti linee guida. Nel 2003 è stato pubblicato il lavoro del gruppo STARD, costituito da un primo documento (Clin. Chem. 49:1 1-6 2003) che propone una checklist e un diagramma di flusso e da un secondo documento
(Clin. Chem. 49:1 7-18 2003) esplicativo. La checklist è una griglia che, mantenendo il classico schema di un lavoro scientifico: titolo, introduzione, metodo, risultati e discussione, organizza i contenuti in 25 punti mandatori. Il diagramma a flusso fornisce un modello che consente di visualizzare la distribuzione dei pazienti, l'applicazione del test oggetto di studio, del test di riferimento nonché la distribuzione dei risultati.
Il documento è di utilità pratica sia per gli Autori che per i lettori. Gli Autori, infatti, hanno a disposizione una traccia dettagliata e standardizzata per il disegno dello studio di accuratezza diagnostica; i lettori trovano nel documento STARD una chiave di lettura critica che consente sia di stimare i potenziali bias, sia di giudicare l'applicabilità del test diagnostico alla propria realtà lavorativa. Ci è sembrato quindi utile proporre, nel nostro laboratorio, un corso di formazione basato sui due documenti citati e diviso in tre fasi. Nella prima, si è provveduto a sensibilizzare i partecipanti alle problematiche dell'accuratezza diagnostica, a tradurre il primo documento e a darne diffusione ai partecipanti. Nella seconda fase, tuttora in corso, i partecipanti vengono divisi in 3 gruppi, ognuno dei quali esamina 5 punti della checklist e lavora sull'esempio della letteratura fornito dal documento. Un tutor è responsabile della presentazione del diagramma a flusso e della sintesi dei lavori dei gruppi. La terza fase, operativa, vede l'analisi di tre lavori di valutazione di test diagnostici mediante gli strumenti STARD. Al termine del percorso, i partecipanti avranno aumentato le proprie competenze sia come fruitori critici della letteratura, sia come operatori di scelte gestionali nell'ambito della Medicina di Laboratorio.

290

VALUTAZIONE DEI LIVELLI SIERICI DEGLI ACIDI BILIARI IN UNA POPOLAZIONE SANA

Baroni S., Capone R., Mascagna G., Minucci A., Rocchetti S., Giannace A., Manieri R., D'Onofrio G.*, Giardina B.

Laboratorio di Chimica Clinica, Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica
*Centro Trasfusionale, Istituto di Ematologia
Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Il dosaggio degli acidi biliari sierici (AcBil) è un test diagnostico semplice, non invasivo e molto sensibile nella valutazione dei disordini epatico-biliari, in grado di riflettere aspetti funzionali del fegato meglio dei test più tradizionali. E' infatti sempre più utilizzato per monitorare le epatosi in gravidanza, le fasi post trapianto di fegato ed i nati prematuri. Nel nostro laboratorio per esigenze organizzative e per meglio rispondere all'incremento delle richieste, abbiamo automatizzato il dosaggio degli AcBil. I valori di riferimento degli AcBil. riportati dalla letteratura sia con kit enzimatici che radioimmunologici, sono inferiori a 6 umol/L.
Il passaggio all'automazione e l'osservazione occasionale di numerosi risultati borderline e/o patologici non giustificabili con il quadro clinico né con altri parametri biochimici in sieri di soggetti sani, ci hanno indotto a determinare i valori di riferimento nella nostra popolazione. Abbiamo studiato 350 donatori di sangue (200 maschi e 150 femmine), omogenei per età (36.5±10.5) ed afferenti al Centro Trasfusionale del Policlinico Gemelli; i prelievi sono stati effettuati al mattino dopo almeno 8 ore di digiuno. Gli AcBil sono stati dosati su siero con metodo enzimatico-colorimetrico (kit Sentinel, Olympus) automatizzato su Olympus AU400; calibratore Sentinel 4.3 umol/L. L'imprecisione è stata valutata a 2 livelli di concentrazione (5 e 28 umol/L) con CV intra-assay rispettivamente di 6 e 2.5% e inter-assay di 9 e 3%. Sugli stessi campioni sono stati anche dosati il colesterolo totale, la bilirubina, la gGT e la fosfatasi alcalina.
I valori di gGT e di bilirubina erano significativamente più alti ($p< 0.001$) nei maschi rispetto alle femmine. I livelli medi di AcBil in tutti i soggetti studiati erano di 5.32±1.68 umol/L, più elevati nei maschi rispetto alle femmine (5.62±1.7 vs 5.03±1.6 umol/L $p= 0.01$). Gli AcBil come atteso, correlavano (paired t test, $p< 0.001$) in entrambi i sessi con colesterolo, bilirubina, fosfatasi alcalina e gGT.
Nella nostra popolazione includendo il 95% centrale, gli intervalli di riferimento sono risultati nei maschi 2.2–9.0 umol/L e nelle femmine 1.8-8.2 umol/L.
Le concentrazioni più alte di AcBil e gGT evidenziate nei maschi potrebbero avere la stessa origine metabolica e funzionale. Questo studio su un significativo numero di soggetti sani ci fa ritenere che i valori di riferimento degli AcBil della letteratura debbano essere rivalutati.

TobiassonP, Kallberg M. Ann Clin Biochem 1980; 17:301-306

291

HEMOCOMPATIBILITY EVALUATION OF SINTHETIC VASCULAR GRAFTS IN RELATION WITH THEIR SILICON CONTENT

Spiller D., Losi P., Briganti E., Kull S., Martinelli I., Soldani G.

Institute of Clinical Phisiology CNR-CREAS, "G.Pasquinucci" Hospital, via Aurelia Sud, Massa(MS).

Background: An unsolved problem found when employing small-diameter vascular grafts (≤5mm), used for aorto-coronaric by-pass chirurgic procedure and in peripheral vascular reconstruction, is the early thrombothic occlusion. Silcrothane is a new elastomeric material, composed of polyurethane cross-linked with several percentages of silicone (polydimethylsiloxane), synthesized in order to realize prostheses with improved hemocompatibility characteristics.
Aim of this study: Evaluate hemocompatibility of Silcrothane vascular grafts in relation to their silicone content.
Methods: In order to investigate the effect of silicone on Silcrothane hemocompatibility, three different percentage of silicone containing prostheses (10, 25 and 40) were evaluated. Prostheses realized with the same commercial polyurethane used to synthesize Silcrothane and silicone medical grade tubes have been used as reference. Grafts hemopatibility was investigated by a circuit in which human blood, anticoagulated with Na-citrate 3,8%, was circulated into different prostheses. The circuit utilises a peristaltic pump modified in order to obtain a passive blood circulation into the prostheses. For each experiment, 40 cm length prostheses were closed to a loop and put in rotation (flow speed 24 cm/s) for 2 hours at 37°C. At the end of the experiments different parameters regarding platelet adhesion and activation were evaluated: 1) circulating platelet count; 2) release of β-Thromboglobulin and P-Selectin from platelets with ELISA tests; 3) platelet CD62P surface expression and amount of monocyte-platelet aggregates using antibody against CD41a, CD45 and CD14 antigens through cytofluorimetric analysis.
Results: we demonstrated that 25 and 40% PDMS Silcrothane prostheses have induced the lowest platelet adesion ($p<0,01$), plasma level of β-TG ($p<0,01$) and lowest amount of monocyte-platelet aggregates ($p<0,01$). No significative variations between the prostheses were observed in the expression of CD62P and in the amount of P-Selectin.
Conclusion: silicone content in the Silcrothane significatively influenced the graft-blood surface interaction, in fact high percentage silicone prostheses have the best hemocompatibility and after further experiments in vitro with sheep blood they will be implanted as by-pass in the common carotid artery of this animal model, according to international protocols.
Reference: Tepe G., Wendel H.P., Khorchidi S., Schmehl J., Wiskirsen J., Pusich B., Claussen C.D., Duda S.H. Thrombogenicity of various endovascular stent types: An in vitro evaluation. J vasc Interv Radiol. 13:1029-1035, 2002.

292

IL FRUTTOSIO COME MARCATORE DI FUNZIONE DELLE VESCICOLE SEMINALI IN PAZIENTI CON INFERTILITA' DI COPPIA.

Baderna F*.,Amadei M*.,Bergamaschi G*.,Donati M.Frasanni M*.,Previtali G*.,Savino A.**

*Dipartimento di Patologia Clinica
** Dipartimento di Chirurgia U.O.di Urologia
P.O. di Fidenza AUSL di PARMA

INTRODUZIONE:
Le ghiandole vescicolari umane sono produttrici di fruttosio e questo zucchero viene universalmente utilizzato come marcatore di funzione. La concentrazione di fruttosio è un indice dell'attività delle vescicole seminali ed ha un ruolo importantissimo nei confronti del metabolismo e quindi della motilità dello spermatozoo. I valori di fruttosio tuttavia risentono del numero degli spermatozoi in maniera inversamente proporzionale .Obiettivo della nostra ricerca è verificare,secondo recenti studi, come il valore di fruttosio, corretto rispetto al numero totale degli spermatozoi mobili, meglio correli con la funzionalità delle vescicole seminali
MATERIALI E METODI
Sono stati analizzati 242 campioni di liquido seminale di pazienti che si rivolgono al nostro centro per infertilità di coppia, di questi i 75 risultati normali secondo i criteri dell'WHO sono stati utilizzati come gruppo di controllo. I valori di fruttosio sono stati corretti tenendo conto del numero di spermatozoi mobili secondo la seguente formula: log [n° spermatozoi mobili] x [fruttosio]. Il fruttosio è stato determinato con metodo cinetico enzimatico della ditta Scil Diagnostic GmbH e adattato su analizzatore LX20 della ditta Beckman. L'elettroforesi a Ph alcalino è stata eseguita su gel di agarosio della ditta Sebia.
RISULTATI
Dai pazienti normali secondo l'WHO sono stati calcolati i valori di riferimento di fruttosio corretto del nostro laboratorio [205-1210 mg/dl] con una mediana di [568mg/dl]. Il confronto con il gruppo di controllo ha evidenziato nei pazienti astenozoospermici (nelle diverse combinazioni) una riduzione statisticamente significativa ($p < 0.05$) dei valori di fruttosio corretto particolarmente significativa nei pazienti astenooligoterato ($p = 0.00001$)
CONCLUSIONI
Dati di letteratura riportano che il valore di fruttosio corretto ha una prevalenza del 47.6% con l'ipofunzione delle vescicole seminali ,lo stesso studio ha evidenziato che su 18 casi di astenozoospermia 12 sono associati con disfunzione delle vescicole seminali (1)
Riteniamo importante che sui campioni con valori di fruttosio corretto bassi venga eseguita l'elettroforesi per differenziare la eventuale riduzione della componente vescicolare dalla fruttolisi dovuta ad un alto numero di spermatozoi o a eventi estranei.
1.G.F.Gonzales.Function of seminal vesicles and their role on male fertily. Asian J.Androl.Dec ;3 : 251-258

INDICE DEGLI AUTORI

AUTORE	COD	PAG
Abbate R.	S2.3	33
Abellan R.	216	169
Abellan R.	217	169
Accinni R.	185	152
Adorno D.	021	67
Afeltra A.	170	145
Afshar H.	076	96
Agostini P.	164	142
Agostini P.	168	144
Ahmida M.H.S.	151	135
Aiosa A.	069	92
Akers L.C.	275	198
Albertini R.	183	151
Albertini R.	202	161
Alborino F.	078	98
Alborino F.	079	98
Alborino F.	077	97
Alborino F.	080	99
Alborino F.	091	105
Alessio M.G.	276	199
Aloe R.	165	142
Alpini C.	183	151
Altamura S.	171	145
Altavilla P.	203	161
Altinier S.	188	154
Altinier S.	199	159
Altinier S.	204	162
Altinier S.	233	177
Amadei M.	292	207
Amadori P.	131	125
Amato G.	069	92
Amboni P.	276	199
Ambrosetti U.	052	83
Ambrosi B.	130	125
Ameglio F.	240	181
Amerio P.L.	214	168
Anastasio P.	068	91
And Chiaramonte M.	021	67
And Zuppi C.	240	181
Andreani S.	042	78
Andreassi M.G.	251	186
Andreassi M.G.	045	80
Andreassi M.G.	051	83
Andreassi M.G.	055	85
Anesi A.	086	102
Anesi A.	S1.4	30
Angelini G.	S6.3	45
Angelucci C.	087	103
Annicchiarico C.	211	165
Anselmi G.	229	175
Antenucci M.	240	181
Antico F.	098	108
Antico F.	099	109
Antonacci M.	163	141
Antonelli F.	089	104
Antonelli G.	S5.4	41
Antonelli M.J.	165	142
Antoniello N.	238	180
Apicella G.	136	128
Aragona G.	243	182
Aragona G.	246	184
Aragona G.	248	185
Aragona G.	257	189
Arcangeli M.	148	134
Arcangeli M.	136	128
Arlotti C.	136	128
Arlotti C.	148	134
Armanini D.	S5.7	43
Armanini D.	120	119
Arnolfo E.	135	127
Arosio P.	S4.2	37
Arsola L.	268	195
Artioli S.	003	58
Artioli S.	S2.3	33
Avogaro M. T.	134	127
Azzarone R.	021	67
Azzena A.	191	155
Babetto E.	076	96
Babetto E.	010	61
Bacciu A.	050	82
Bacelle L.	091	105
Baderna F.	292	207
Bagnati M.	144	132
Bajetta E.	265	193
Balagi S.	112	115
Balboni F.	104	111
Balboni F.	106	112
Balboni F.	230	176
Ballerini S.	169	144
Ballerini S.	049	82
Ballerini S.	170	145
Bamonti F.	101	110
Bamonti F.	255	188
Bamonti F.	256	189
Bamonti F.	185	152
Bandello F.	072	94
Baquero Herrera C.	238	180
Baraghini G.F.	S1.4	30
Barassi A.	270	196
Barassi A.	273	197
Barassi A.	219	170
Barassi A.	247	184
Barassi A.	262	192
Barberis M.	159	139
Barberis M.	226	174
Barberis M.	S2.4	33
Barca M.	035	75
Barca M.	046	80
Barillari G.	072	94
Baritono E.	048	81
Baritono E.	059	87
Barletta E.	271	196
Baroni S.	287	205
Baroni S.	290	206
Baroni S.	236	179
Barretta E.	093	106
Barrocu M.	241	181
Barzon L.	040	77
Basile M.	144	132
Bassi A.	182	151
Bassi L.	278	200
Bassi L.	008	60
Basso D.	156	138
Basso D.	242	182
Basso D.	243	182
Basso D.	246	184
Basso D.	036	75
Basso D.	248	185
Basso D.	250	186
Basso D.	259	190
Basso D.	260	194
Basso D.	064	89
Basso D.	063	89
Basso L.	125	122
Bastagli A.	042	78
Batistoni A.	112	115
Battaglia D.	180	150
Battaglia P.	048	81
Battaglia P.	059	87
Battaglioli L.	056	85
Battipaglia E.	245	183
Battista R.	099	109
Battistelli L.	165	142
Battistini S.	024	69
Battistoni C.	021	67
Bavazzano P.	289	206
Bazzurini A.	138	129
Belfanti P.	124	122
Bellati P.	271	196
Bellenzier M.	187	153
Bellenzier M.	198	159
Bellenzier M.	200	160
Bellenzier M.	001	57
Bellesi G.P.	106	112
Belli M.	143	131
Belli M.	147	133
Bellincampi L.	049	82
Bellincampi L.	170	145
Bellitti F.	020	67
Bellomo G.	144	132
Bellucci P.	281	201
Belluco C.	036	75
Bellver M.	216	169
Beltrame F.	189	154
Beltrami G.	102	110
Belvini D.	020	67

AUTORE	COD	PAG
Benedetti T.	276	199
Benincaso L.	133	126
Bennato V.	096	107
Berardi V.	S7.3	49
Berardinelli L.	255	188
Bergamaschi G.	292	207
Bergamini E.	126	123
Bergonzini G.	103	111
Bernabini S.	038	76
Bernacchi F.	185	152
Bernardi D.	184	152
Bernardi F.	S4.1	36
Bernardini S	170	145
Bernardini S.	169	144
Bernardini S.	049	82
Bernardini S.	172	146
Berni Canani R.	044	79
Berni R.	179	149
Berti S.	051	83
Bertiato B.	248	185
Bertolani M.	088	103
Bertoli I.	S6.4	46
Bertolini S.	028	71
Bertolini S.	242	182
Bertolini S.	248	185
Bertolini S.	259	190
Bertolini S.	060	87
Bertolo M.	095	107
Bertozzo L.	189	154
Bertucci P.	151	135
Bertulu S.	191	155
Berutti C.	144	132
Besana S.	061	88
Bettin C.	S6.2	44
Bettinardi N.	178	149
Bettini R.	113	116
Bevilacqua N.	277	199
Bevilacqua S.	051	83
Biagini A.	045	80
Biagini A.	051	83
Biagini A.	201	160
Biagini A.	055	85
Bianchi G.	208	164
Bianchi L.	017	65
Bianchi L.	041	78
Bianchi P.	274	198
Bianchi P.	004	58
Bianchi P.	005	59
Biedo F.C.	248	185
Biffoni F.	072	94
Binder S.R.	S8.2	51
Biondi M.L.	016	65
Biondi M.L.	042	78
Bioni M.L.	056	85
Bisci E.	270	196
Bitti P.P.	046	80
Bitti PP.	035	75
Bivona G.	203	161
Bizzari B.	260	194
Boggio-Lera G.	124	122
Bombara M.	137	128
Bombara M.	128	124
Bombardieri E.	265	193
Bonadonna G.	134	127
Bonadonna G.	091	105
Bonaguri C.	165	142
Bonanni G.	120	119
Bonardi L.	127	123
Bonavolontà L.	161	140
Bondanini F.	222	172
Bonetti G.	192	156
Bonetto M.G.	189	154
Bonfant G.	124	122
Boni C.	251	186
Boni G.	211	165
Bonifati C.	066	90
Bonini F.	089	104
Bonini F.	094	106
Bonini P.A.	S3.1	34
Bonini P.A.	132	126
Bonucci A.F.	275	198
Bonvicini P.	078	98
Bonvicini P.	079	98
Bonvicini P.	085	102
Bonvicini P.	064	89
Bonvicini P.	077	97
Bonvicini P.	080	99
Borghi Maria Francesca	176	148
Borgiani L.	078	98
Borgiani L.	079	98
Borgiani L.	077	97
Borgiani L.	080	99
Borrelli R.	093	106
Borroni P.	183	151
Borto R.	191	155
Bortolotti F.	134	127
Bortolotti F.	272	197
Bosari S.	224	173
Bosi S.	246	184
Bosio K.	070	93
Bosoni T.	186	153
Bossi G.	078	98
Bossi G.	079	98
Bossi G.	077	97
Bossi G.	080	99
Bossuyt P. M.M.	LP1	27
Bot S.	218	170
Botoni M.	017	65
Botta N.	223	172
Bottalico S.	133	126
Botto N.	251	186
Botto N.	045	80
Botto N.	051	83
Botto N.	055	85
Bottoni A.	211	165
Bozzi M.	179	149
Bozzini C.	189	154
Brambilla D.	052	83
Brambilla M.	145	132
Briganti A.	132	126
Briganti E.	291	207
Brogioni M.	271	196
Brogioni M.	082	100
Brogioni M.	009	61
Brogioni M.	S2.3	33
Brown P.	S7.3	49
Brunati P.	119	119
Brunetti M.	285	203
Bruno E.M.	161	140
Brusca I.	158	139
Bucci M.	286	204
Bugari G.	123	121
Bugari G.	127	123
Buglione E.	144	132
Buongiovanni A.	143	131
Buongiovanni A.	147	133
Burighel A.	078	98
Burighel A.	079	98
Burighel A.	077	97
Burighel A.	080	99
Busi D.	123	121
Buttarello M.	110	114
Buttarello M.	115	117
Buttarello M.	091	105
Cabrio A.	030	72
Cabrio L.	019	66
Caccamo D.	018	66
Caforio M.P.	006	59
Caforio M.P.	116	117
Caimi L.	123	121
Caimi L.	127	123
Calabria S.	222	172
Calabrò G.	069	92
Caldaroni L.	244	183
Caldaroni L.	252	187
Caldini A.	104	111
Caldini A.	106	112
Caldini A.	230	176
Callà C.	S6.5	46
Calugi A.	169	144
Campana C.	202	161
Campioli D.	103	111
Campolo J.	185	152
Cancellieri E.	268	195
Cancellieri E.	207	163
Cangiano G.	181	150
Cannella P.	118	118
Canonica G.W.	249	185

AUTORE	COD	PAG
Cantini F.	S8.4	53
Capizzi R.	214	168
Capoluongo E.	240	181
Capone R.	290	206
Capone R.	236	179
Caponnetto C.	024	69
Cappelletti V.	265	193
Cappellin E.	S5.4	41
Caprari P.	006	59
Caprari P.	116	117
Carazzone C.	139	129
Carbone L.	205	162
Carbone MT.	039	77
Carcassi C.	024	69
Cardillo G.	039	77
Cardillo G.	044	79
Cardin R.	036	75
Cardone F.	S7.3	49
Carducci G.	253	187
Carella A.M.	102	110
Carella Jr A.M.	102	110
Carini M.	255	188
Carletti M.	253	187
Carletto R.	095	107
Carloni C.	248	185
Carminati V.	276	199
Carniato A.	173	146
Caroli S.	008	60
Caropreso A.	144	132
Carosella R.	209	164
Carraro P.	076	96
Carraro P.	010	61
Carraro P.	091	105
Carratù M.	093	106
Carrera P.	024	69
Carrieri P.B.	161	140
Carroccio A.	158	139
Carrozza C.	240	181
Carrozza C.	121	120
Carru C.	028	71
Carru C.	029	72
Carru C.	034	74
Carru C.	035	75
Carru C.	141	130
Carru C.	046	80
Carru C.	050	82
Carru C.	261	191
Carru C.	174	147
Carru C.	060	87
Caruana P.	242	182
Caruana P.	243	182
Caruana P.	246	184
Caruana P.	248	185
Caruana P.	250	186
Caruana P.	260	194
Carusillo G.	026	70
Carusillo G.	033	74
Caruso R.	185	152
Casabella G.	215	168
Casali D.	136	128
Casali D.	148	134
Cascio A.	067	91
Casellato S.	224	173
Casini M.	239	180
Casparrini G.	163	141
Cassani C.	144	132
Castagliuolo I.	040	77
Castagni A.	050	82
Castaldi E.	S4.1	36
Castaldo G.	020	67
Castaldo G.	039	77
Castaldo G.	044	79
Castellana N.	148	134
Castellani V.	008	60
Castiglione C.	190	155
Castorina P.	052	83
Casula M.	024	69
Catacchio F.	193	156
Catania G.	187	153
Catania G.	198	159
Catania G.	200	160
Catenacci R.	113	116
Cattozzo G.	232	177
Cauci S.	215	168
Causarano R.	024	69
Cavalcanti E.	277	199
Cavallaro L.G.	242	182
Cavallaro L.G.	243	182
Cavallaro L.G.	246	184
Cavallaro L.G.	248	185
Cavallaro L.G.	250	186
Cavallaro L.G.	254	188
Cavallaro L.G.	257	189
Cavallaro L.G.	259	190
Cavallaro L.G.	260	194
Cavallini G.	126	123
Cavestro G. M.	248	185
Cavestro G.M.	242	182
Cavestro G.M.	243	182
Cavestro G.M.	246	184
Cavestro G.M.	250	186
Cavestro G.M.	254	188
Cavestro G.M.	257	189
Cavestro G.M.	260	194
Cazzola M.	S4.2	37
Cazzola R.	238	180
Cecchetti F.	166	143
Cecchi F.	047	81
Cecchin A.	247	184
Cecchini F.	016	65
Cecere R.	125	122
Ceddia m.	133	126
Celadin M.	184	152
Celio L.	265	193
Centoni R.	129	124
Centonze G.	280	201
Ceppi P.	224	173
Cerillo A.G.	201	160
Cerillo A.G.	264	193
Ceriotti F.	078	98
Ceriotti F.	220	171
Ceriotti F.	079	98
Ceriotti F.	077	97
Ceriotti F.	080	99
Ceroni V.	136	128
Ceroni V.	148	134
Cervelli C.	021	67
Cestaro B.	238	180
Chelli M.	223	172
Cherchi G.B.	191	155
Chiappin S. Gatti R.	S5.4	41
Chiapponi I.	112	115
Chiesa M.R.	S8.4	53
Chiosi E.	195	157
Chiozzi M.	078	98
Chiozzi M.	079	98
Chiozzi M.	077	97
Chiozzi M.	080	99
Ciacchi E.	S5.5	42
Ciaccio M.	203	161
Cianciulli M.R.	032	73
Cianciulli P.	006	59
Ciani S.	271	196
Ciantra G.	190	155
Ciatto S.	210	165
Cilento M.	249	185
Cilento M.	079	98
Cilento M.	077	97
Cillari E.	067	91
Cillari E.	118	118
Cinti B.	244	183
Cinti B.	252	187
Cioffari V.	129	124
Ciola P.	109	114
Cioni G.	146	133
Cioppi G.	107	113
Cirillo P.	044	79
Ciuti R.	267	194
Ciuti R.	271	196
Clerico A.	196	158
Clerico A.	045	80
Clerico A.	S1.3	29
Clerico A.	201	160
Clerico A.	055	85
Clerico A.	263	192
Clerico A.	264	193
Cocchi G.	014	63
Cocci F.	180	150

AUTORE	COD	PAG
Cocco C.	088	103
Cocco E.	031	73
Cocco G.	078	98
Cocco G.	079	98
Cocco G.	077	97
Cocco G.	080	99
Cocco R.	105	112
Cohen R.	S8.4	53
Colacicco L.	S6.5	46
Colacico A.	168	144
Coliva A.	122	121
Colla G.	246	184
Collell M.	119	119
Colombatti A.	218	170
Colombi R.	274	198
Colombo C.	096	107
Colotti C.	022	68
Colotti C.	157	138
Colotti C.	126	123
Colzani C.	119	119
Coman C.	130	125
Comelini L.	278	200
Comparato G.	248	185
Condello S.	018	66
Consiglio P.	069	92
Consolaro G.	048	81
Conte R.	S8.4	53
Conti A.	171	145
Coppa G.	244	183
Coppa G.	252	187
Coppola A.	020	67
Corda D.	241	181
Cordani N.	224	173
Corrente V.	250	186
Corrente V.	254	188
Corrocher R.	189	154
Corrocher R.	182	151
Corsi M.M.	130	125
Cortese C.	151	135
Cortese C.	097	108
Cortese C.	049	82
Cortese C.	170	145
Cortese C.	172	146
Corvo E.	255	188
Costantini D.	096	107
Covino M.	205	162
Cozza A.	054	84
Cozzi M.G.	S4.3	37
Cozzi M.G.	282	202
Cremaschi A.	081	99
Cremonesi L.	S4.2	37
Cresci L.	207	163
Crippa M.	276	199
Crisafulli G.	018	66
Cristoferi M.	124	122
Cristoni S.	145	132
Crognale S.	105	112
Crollo R.	212	166
Cuccia C.	192	156
Cupisti A.	245	183
Curcillo M.	262	192
Currò M.	018	66
D'Altoe' P.	100	109
D'Altoe' P.	110	114
D'Amario C.	285	203
D'Amato G.	249	185
Da Prati E.	088	103
Da Rin G.	091	105
Dadorante V.	162	141
Daidone M.G.	265	193
Dal Bello F.	015	64
Dal Bo' N.	257	189
Dal Bo' N.	259	190
Dal Bó N.	242	182
Dal Bó N.	243	182
Dal Bò N.	246	184
Dal Bò N.	250	186
D'Alessandro P.	061	88
DallaDea E.	229	175
D'Amato G.	244	183
D'Amato G.	252	187
D'Amora M.	143	131
D'Amora M.	147	133
D'Amora M.	181	150
D'Angelo A.	065	90
D'Angelo A.	071	94
Daniele A.	039	77
Daudon M.	287	205
Daverio R.	132	126
Davoli E.	103	111
De Angelis G.L.	260	194
De Bernardis M.	268	195
De Carolis C.	169	144
De Cerchio C.	202	161
De Fanti E.	048	81
De Fanti E.	059	87
De Filippis R.	263	192
De Francesco F.	068	91
De Leo C.	025	70
De Leo C.	031	73
De Luca G.	183	151
De Luca G.	231	176
De Lucia D.	068	91
De Michele S.	069	92
De Michele T.	214	168
De Nes M.	107	113
De Palo E. F.	S5.4	41
De Paoli G.	134	127
De Paoli G.	272	197
De Pasquale L.	042	78
De Sole P.	108	113
De Sole P.	117	118
De Sole P.	205	162
De Stasio G.	072	94
De Vecchi A.	101	110
De Vendittis E.	012	62
Degan M.	111	115
Degan M.	114	116
Deiana G.A.	241	181
Deiana L.	028	71
Deiana L.	029	72
Deiana L.	034	74
Deiana L.	035	75
Deiana L.	141	130
Deiana L.	046	80
Deiana L.	050	82
Deiana L.	261	191
Deiana L.	174	147
Deiana L.	060	87
Del Giudice G.	187	153
Del Giudice G.	198	159
Del Giudice G.	200	160
Del Giudice G.	001	57
Del Prete S.	244	183
Del Prete S.	252	187
Del Ry S.	022	68
Del Ry S.	157	138
Del Ry S.	126	123
Del Ry S.	194	157
Deligios M.	060	87
Della Noce C.	185	152
Dello Russo P.	072	94
Delprete E.	197	158
Dente B.	078	98
Dente B.	277	199
Dente B.	249	185
Dente B.	079	98
Dente B.	077	97
Dente B.	080	99
D'Eri N.	109	114
D'Ettore M.	178	149
Di Benedetto C.	006	59
Di Cecco P.	211	165
Di Fede G.	258	190
Di Felice G.	253	187
Di Fonzo A.	224	173
Di Giovannandrea R.	217	169
Di Maina E.	181	150
Di Maio C.	069	92
Di Mario F.	242	182
Di Mario F.	243	182
Di Mario F.	246	184
Di Mario F.	036	75
Di Mario F.	248	185
Di Mario F.	250	186
Di Mario F.	254	188
Di Mario F.	257	189
Di Mario F.	259	190

AUTORE	COD	PAG
Di Mario F.	260	194
Di Matteo F.	070	93
Di Mele A.L.	162	141
Di Minno G.	020	67
Di Natale R.	069	92
Di Ninno E.	136	128
Di Nocera P.	143	131
Di Nocera P.	147	133
Di Pinto A.	136	128
Di Pinto A.	148	134
Di Rita R.	136	128
Di Sante A.	285	203
Di Santolo M.	215	168
Di Serio F.	193	156
Di Serio F.	083	101
Di Spigna G.	161	140
Di Vitofrancesco N.	010	61
Diociaiuti A.	214	168
Divella R.	212	166
Dogliosi C.	248	185
Dolci A.	159	139
Dolci A.	S5.1	38
Dolci A.	226	174
Dolci A.	S2.4	33
Doliana R.	218	170
Dominici L.	121	120
Donadei S.	037	76
Donati M.	292	207
d'Onofrio G.	S5.3	39
D'Onofrio G.	290	206
D'Ottavio D.	S5.6	42
Dragonetti D.	162	141
Duca L.	150	135
Duca M.L.	S4.3	37
Duca M.L.	282	202
Durante C.	063	89
Emdin .	175	147
Emdin M.	157	138
Emdin M.	194	157
Emdin M.	S1.3	29
Erario M.	056	85
Errigo A.	028	71
Errigo A.	034	74
Errigo A.	050	82
Errigo A.	174	147
Errigo A.	060	87
Esposito C.	142	131
Esposito P.	086	102
Evangelista I.	239	180
Fabbri F.	132	126
Facchinato V.	010	61
Faccini G.	189	154
Faggian D.	S5.7	43
Fagnani F.	239	180
Falciani C.	137	128
Falciani C.	128	124
Falda A.	156	138
Falda A.	036	75
Falda A.	064	89
Falda A.	063	89
Falsetti L.	123	121
Faranna C.	069	92
Faricelli R.	162	141
Farinati F.	036	75
Farinati F.	040	77
Fasanella S.	225	173
Favini P.	224	173
Federici C.	045	80
Federici C.	051	83
Federici C.	055	85
Federici G.	151	135
Federici G.	097	108
Federici G.	169	144
Federici G.	049	82
Federici G.	170	145
Federici G.	172	146
Fedi S.	112	115
Felicetta I.	096	107
Ferillo G.	286	204
Fermo I.	065	90
Fermo I.	S4.2	37
Fermo I.	071	94
Ferrarese S.	S6.2	44
Ferrari E.	238	180
Ferrari F.	S4.2	37
Ferrari F.	008	60
Ferrari L.	122	121
Ferrari L.	265	193
Ferrari M.	S4.2	37
Ferrari P.	167	143
Ferraris M.	025	70
Ferraris M.	031	73
Ferrera L.	024	69
Ferrero C.A.	078	98
Ferrero C.A.	079	98
Ferrero C.A.	077	97
Ferrero C.A.	080	99
Ferrero S.	224	173
Ferri N.	276	199
Fiaschi E.	097	108
Figoni O.	277	199
Filieri R.	122	121
Filippi G.	162	141
Filocamo M.	136	128
Filocamo M.	148	134
Finazzi Agro' E.	049	82
Finazzi S.	247	184
Finazzi S.	262	192
Fineschi D.	053	84
Fioratto R.	061	88
Fiore C.	S5.7	43
Fiore C.	120	119
Fiorini M.	112	115
Fiorini M.	094	106
Fioroni A.M.	021	67
Fitzgerald S.P.	275	198
Flagiello A.	104	111
Floridia A.	146	133
Fogar P.	156	138
Fogar P.	036	75
Fogar P.	064	89
Fogar P.	063	89
Fogazzi G.B.	287	205
Foglia Manzillo E.	212	166
Foglieni B.	S4.2	37
Fontana A.	164	142
fontana A.	168	144
Fontana A.	280	201
Fontanella C.	086	102
Fontani G.	196	158
Fontani G.	264	193
Fornaroli A.	086	102
Forni F.	S6.5	46
Forni F.	214	168
Forni M.	188	154
Forni M.	199	159
Forni M.	204	162
Forte F.	181	150
Fortina A.	144	132
Fortunato A.	S8.5	54
Franceschini C.	054	84
Franceschini R.	123	121
Franze' A.	257	189
Franze' A.	259	190
Franzè A.	254	188
Franzini C.	220	171
Franzini C.	228	175
Franzò L.	151	135
Frasanni M.	292	207
Frasca L.	113	116
Fratini A.	289	206
Frattini M.	273	197
Fredella F.	S6.2	44
Freggia S.	107	113
Frezzotti A.	075	96
Friso S.	189	154
Friso S.	182	151
Frusconi S.	038	76
Fruttero A.	135	127
Fulceri F.	221	171
Fulceri F.	166	143
Fulceri F.	167	143
Fulgido V.	107	113
Fuller D.C.	275	198
Fumagalli C.	150	135
Fumagalli E.	222	172
Fusco A.	195	157
Fusco A.	222	172

AUTORE	COD	PAG
Galfré S.	054	84
Galimberti D.	256	189
Gallai R.	106	112
Galliani M.	222	172
Gallo N.	156	138
Gallo N.	036	75
Gallo N.	064	89
Gallo N.	063	89
Galzignato O.	076	96
Gambera A.	123	121
Gambera A.	127	123
Ganadu M.	152	136
Ganadu M.	155	137
Garghetti E.	S4.3	37
Garghetti E.	282	202
Garigali G.	287	205
Garrè C.	024	69
Garzella G.	129	124
Gaspare De Santo N.	068	91
Gasparri L.	053	84
Gasparrini A.	011	62
Gasperoni S.	197	158
Gassi P.	083	101
Gechtman C.	139	129
Gechtman C.	150	135
Genco R.	280	201
Genovese S.	139	129
Genovesi M.	129	124
Gerani C.	189	154
Germana' B.	248	185
Gerthoux P.M.	125	122
Gerthoux P.M.	145	132
Gervasi M.	138	129
Gessoni G.	098	108
Gessoni G.	099	109
Ghiara F.	283	202
Ghilardi G.	016	65
Ghilardi G.	056	85
Ghinami F.	112	115
Ghio S.	202	161
Giaccone G.	258	190
Giacobini A.	S2.3	33
Giacomello R.	072	94
Giacomin C.	S6.1	44
Giacomini A.	098	108
Giacomini A.	099	109
Giagheddu M.	024	69
Giampietro O.	239	180
Giampietro O.	245	183
Gianetti J.	263	192
Giannace A.	290	206
Giannelli I.	196	158
Giannelli I.	264	193
Giannessi D.	022	68
Giannessi D.	157	138
Giannessi D.	126	123
Giannessi D.	194	157
Giannini F.	024	69
Giardina B.	S6.5	46
Giardina B.	240	181
Giardina B.	287	205
Giardina B.	154	137
Giardina B.	225	173
Giardina B.	290	206
Giardina B.	214	168
Ginanneschi R.	174	147
Ginesu F.	034	74
Giocoli G.	S1.5	30
Gioia M.	118	118
Giommi S.	105	112
Gion M.	078	98
Gion M.	079	98
Gion M.	077	97
Gion M.	080	99
Gion M.	091	105
Giorda R.	052	83
Giordani E.	078	98
Giordani E.	079	98
Giordani E.	007	60
Giordani E.	077	97
Giordani E.	080	99
Giovannini F.	279	200
Giovannini F.	146	133
Giove C.	230	176
Girelli D.	189	154
Girelli D.	182	151
Girolami A.	019	66
Girolami A.	030	72
Girolami F.	047	81
Girolami F.	058	86
Girone E.	168	144
Giubbini R.	192	156
Giudici E.	231	176
Giuffrè I.	023	68
Giunta F.	166	143
Giuntoli C.	041	78
Glauber M.	264	193
Gnasso A.	097	108
Goi G.	238	180
Gombacci A.	S5.5	42
Gomez A.M.	031	73
Gomiero B.	247	184
Gonano F.	072	94
Gonella E.	145	132
Gorini M.	185	152
Gottardo R.	272	197
Governatori D.	075	96
Gozzo M.L.	S6.5	46
Grandi A.	231	176
Granzotto M.	015	64
Granzotto M.	019	66
Grassini A.	268	195
Grasso L.	129	124
Graziani M.S.	002	57
Graziani MS.	229	175
Greco C.	105	112
Greco E.	156	138
Greco E.	036	75
Greco E.	064	89
Greco E.	063	89
Greco G.	024	69
Greco G.	109	114
Greco M.M.	102	110
Greghi D.	144	132
Grimau-Merino R.	059	87
Guadagnin M.	076	96
Guagnellini E.	016	65
Guagnellini E.	042	78
Guagnellini E.	056	85
Guala A.	266	194
Guarini P.	182	151
Guarino M.D.	169	144
Guarino R.	266	194
Guarneri P.	057	86
Guarneri P.	062	88
Guatto E.	215	168
Gueli M.C.	153	136
Guerra E.	078	98
Guerra E.	079	98
Guerra E.	077	97
Guerra E.	080	99
Guglielmini E.	203	161
Gugliotta M.R.	153	136
Guidi B.	214	168
Guidi G.C.	111	115
Guidi G.C.	114	116
Guidi I.	256	189
Guido M.	040	77
Gupta S.	044	79
Harry D.	234	178
Hellies A.	045	80
Hellies A.	051	83
Hellies A.	055	85
Herzog M.C.	173	146
Hurle C.	112	115
Iacobello C.	123	121
Iacobello C.	127	123
Iannaccone C.	269	195
Ientile R.	018	66
Iervasi A.	175	147
Iervasi A.	211	165
Iervasi G.	211	165
Illiano F.	195	157
Illiano G.	195	157
Incorvaia L.R.	092	105
Infantino M.	169	144
Infantino M.	170	145
Infantino M.	172	146

AUTORE	COD	PAG
Infusino I.	228	175
Ingrassia A.	069	92
Innocenti B.	239	180
Innocenti B.	245	183
Innocenti F.	106	112
Iori r.	049	82
Iori R.	170	145
Iori V.	242	182
Iori V.	246	184
Iori V.	248	185
Iori V.	250	186
Iori V.	254	188
Iori V.	257	189
Iorio A.	093	106
Ippolito S.	101	110
Ippolito S.	234	178
Irace C.	097	108
Jorgensen P. E.	S1.1	28
Karbowiak I.	120	119
Karousou E.	231	176
Klersy C.	202	161
Knijn A.	006	59
Kull S.	291	207
La Chiusa S.M.	158	139
La Gioia A.	137	128
La Gioia A.	223	172
La Gioia A.	112	115
La Gioia A.	128	124
La Gioia A.	094	106
La Torre A.	016	65
Labbozzetta M.	203	161
Ladogana P.	161	140
Lai G.	011	62
Lala A.	151	135
Lalatta F.	052	83
Lamont J.	275	198
Lando G.	023	68
Lando G.	024	69
Lando G.	052	83
Lanzano G.	171	145
Lanzano R.	171	145
Lanzi R.	132	126
Latte A.	181	150
Lattuada L.	057	86
Lattuada L.	062	88
Lauri F.	115	117
Lauriola G.	163	141
Lavatelli F.	186	153
Lavosi M.	205	162
Lazzerini S.	177	148
Leandro G.	243	182
Leandro G.	250	186
Leandro G.	254	188
Lechi C.	111	115
Lechi C.	114	116
Lecis P.	248	185
Lelli L.	107	113
Lentati P.	237	179
Leone L.	025	70
Leone L.	031	73
Leone L.	119	119
Leoni A.	223	172
Leoni A.	089	104
Leoni V.	183	151
Levi S.	S4.2	37
Li Vecchi M.	203	161
Liatopoulou S.	248	185
Liatopoulou S.	257	189
Liberatoscioli L.	097	108
Liberatoscioli L.	172	146
Liccardi G.	249	185
Limido L.	258	190
Limonta G.	125	122
Lippa L.	284	203
Lippi G.	S5.2	39
Liu Q.	S7.3	49
Lo Nigro C.	135	127
Loiodice L. Di Serio F.		168
144		
Lolli I.	212	166
Lombardi A.M.	015	64
Lombardi A.M.	019	66
Lombardi A.M.	030	72
Lombardo A.	238	180
Lombardo F.	025	70
Lombardo F.	031	73
Lombino F.	069	92
Lonati S.	101	110
Lonati S.	255	188
Lonati S.	256	189
Lonati S.	185	152
Longhi E.	159	139
Longhi E.	226	174
Losi P.	291	207
Lotto V.	189	154
Lotzniker M.	262	192
Lovero R.	168	144
Lu M.	S7.3	49
Lubrano V.	180	150
Luceri F.	267	194
Luceri F.	104	111
Lucio F.	135	127
Lulli P.	240	181
Lulli P.	121	120
Lupi I.	129	124
Lupo T.	012	62
Luraschi P.	228	175
Maceratesi L.	121	120
Maestroni C.	276	199
Maffi D.	006	59
Maffini V.	260	194
Maggiolini P.	280	201
Magi A.	038	76
Magni F.	224	173
Magrini G.	202	161
Maiavacca R.	096	107
Maini A.	254	188
Maino M.	254	188
Majolo M.	093	106
Malatesti V.	288	205
Malatesti V.	281	201
Malavazos A.	130	125
Maldera U.	052	83
Malerba C.	169	144
Malesci P.	230	176
Maltinti M.	194	157
Mammoli C.	129	124
Manca M.M.	191	155
Mancinelli N.	285	203
Manetti L.	129	124
Manfredi S.	045	80
Manfredi S.	051	83
Manfredi S.	055	85
Manfredini E.	023	68
Manfredini E.	052	83
Manganiello M.	107	113
Mangione M.	119	119
Mani A.R.	234	178
Manieri R.	290	206
Manni A.	154	137
Manno C.	066	90
Mannucci L.	097	108
Manoni F.	091	105
Mantovani D.	128	124
Mantovani L.	002	57
Mantovani N.	254	188
Manunta A.	152	136
Manunta A.	155	137
Manzato F.	078	98
Manzato F.	079	98
Manzato F.	077	97
Manzato F.	080	99
Manzin A.	112	115
Manzone F.	221	171
Manzone F.	166	143
Manzone F.	167	143
Marabini A.	113	116
Marasini B.	056	85
Maratta A.	069	92
Marchei E.	216	169
Marchei E.	217	169
Marchetti G.	S4.1	36
Marchioro L.	140	130
Marchioro L.	149	134
Marchioro L.	233	177
Marciano S.	037	76
Marcolla A.	131	125
Marcucci F.	257	189

AUTORE	COD	PAG
Mari C.	025	70
Mari C.	031	73
Marigo B.	076	96
Marigo B.	S6.1	44
Marigo B.	010	61
Marin M.G.	057	86
Marin M.G.	062	88
Marini I.	151	135
Marini M.	229	175
Marini M.	088	103
Marini V.	024	69
Marinucci S.	222	172
Mariotti M.	239	180
Mariotti V.	054	84
Marocchi A.	023	68
Marocchi A.	024	69
Marocchi A.	052	83
Marogna M.C.	191	155
Marotta R.	068	91
Marozzi R.	026	70
Marozzi R.	033	74
Marraccini P.	180	150
Marradi P.L.	111	115
Marranca D.	S8.3	52
Marseglia M.G.	038	76
Marsico S.	083	101
Martelli C.	177	148
Martina C.	202	161
Martinelli C.	223	172
Martinelli C.	089	104
Martinelli I.	291	207
Martinelli N.	189	154
Martinelli N.	182	151
Martinetti A.	122	121
Martinetti A.	265	193
Martino E.	129	124
Martinotti S.	162	141
Martucci M.	042	78
Masarin A.	139	129
Masarin A.	150	135
Mascagna G.	290	206
Mascagna G.	236	179
Mascia V.	024	69
Mascitelli M.	190	155
Maselli E.	023	68
Masiero S.	120	119
Masini A.	279	200
Masini A.	146	133
Masini S.	175	147
Masini S.	S8.4	53
Massaccesi L.	238	180
Massari G.	219	170
Massaro A.	083	101
Massimino M.	122	121
Massoud R.	151	135
Mastrolonardo P.	083	101
Mattarello MJ.	120	119
Matteucci A.	112	115
Matteucci E.	239	180
Matteucci E.	245	183
Mauri R.	197	158
Mayr A.	078	98
Mayr A.	079	98
Mayr A.	077	97
Mayr A.	080	99
Mazzarella A.	193	156
Mazzeo A.	032	73
Mazzocca M.	052	83
Mazzola G.	065	90
Mazzola G.	071	94
Mazzucato P.	233	177
McConnell I.	275	198
Meccariello P.	142	131
Mediate D.	119	119
Melideo D.	021	67
Mellone M.C.	160	140
Melpignano L.	212	166
Melzi D'Eril G.	186	153
Melzi D'Eril G.V.	183	151
Melzi D'Eril G.V.	037	76
Melzi D'Eril G.V.	270	196
Melzi D'Eril G.V.	273	197
Melzi D'Eril G.V.	219	170
Melzi D'Eril G.V.	247	184
Melzi D'Eril G.V.	262	192
Melzi D'Eril G.V.	231	176
Melzi D'Eril G.V.	232	177
Menapace P.	131	125
Menchini U.	058	86
Menichini F.	S6.2	44
Menozzi I.	069	92
Mercuri A.	S1.3	29
Mercuri A.	S8.4	53
Merli R.	242	182
Merli R.	243	182
Merli R.	246	184
Merli R.	248	185
Merli R.	250	186
Merli R.	254	188
Merli R.	257	189
Merli R.	259	190
Merli R.	260	194
Merlini G.	186	153
Merlini G.	247	184
Merlini G.	037	76
Merlotti C.	228	175
Messeri F.	S8.1	51
Messeri G.	267	194
Messeri G.	271	196
Messeri G.	104	111
Messeri G.	106	112
Messeri G.	003	58
Messeri G.	082	100
Messeri G.	S2.3	33
Messeri G.	230	176
Metelli M.R.	221	171
Metelli M.R.	179	149
Metelli M.R.	166	143
Metelli M.R.	167	143
Meyer R.	S7.3	49
Miano L.	121	120
Miano R.	049	82
Miccichè S.	203	161
Micelli M.	066	90
Migliardi M.	S8.3	52
Milanesi B.	014	63
Minneci S.	177	148
Minucci A.	154	137
Minucci A.	225	173
Minucci A.	290	206
Minuz P.	111	115
Minuz P.	114	116
Mion M.	188	154
Mion M.	199	159
Mion M.	204	162
Misso M.	068	91
Mocarelli P.	224	173
Mocarelli P.	145	132
Mocarelli P.	061	88
Modena N.	284	203
Molesini L.	100	109
Molesini L.	115	117
Molinaro M.	139	129
Molino D.	068	91
Molteni P.	061	88
Monica C.	165	142
Montanelli A.	268	195
Montanelli A.	207	163
Montani A.	086	102
Montani A.N.	013	63
Monteggia M.	232	177
Montegrosso S.	093	106
Monteleone M.	119	119
Montesi G.	111	115
Moore K.	234	178
Moratti R.	186	153
Moratti R.	183	151
Moratti R.	037	76
Moratti R.	202	161
Morelli B.	S4.3	37
Morelli B.	282	202
Moretti L.	237	179
Moretti M.	197	158
Mori M.	078	98
Mori M.	288	205
Mori M.	079	98
Mori M.	281	201
Mori M.	077	97

AUTORE	COD	PAG
Mori M.	080	99
Morricone L.	130	125
Morrocchi B.	106	112
Morrocchi B.	230	176
Mosca A.	220	171
Moussa A.	248	185
Moussa A.M.	242	182
Moussa A.M.	243	182
Moussa A.M.	246	184
Moussa A.M.	250	186
Moussa A.M.	257	189
Moussa A.M.	259	190
Moussa A.M.	260	194
Munaretto G.	098	108
Munegato G.	276	199
Mura G.L.	152	136
Mura G.L.	155	137
Muratore M.T.	236	179
Murtas R.	119	119
Musi G.	224	173
Musino L.	035	75
Musino L.	046	80
Mussap M.	227	174
Mussap M.	233	177
Mutinelli F.	S7.2	48
Mutti S.	262	192
Naitana A.	235	178
Nannetti G.	038	76
Nardiello P.	020	67
Nauti A.	219	170
Navaglia F.	156	138
Navaglia F.	030	72
Navaglia F.	036	75
Navaglia F.	064	89
Navaglia F.	063	89
Navarretta R.	124	122
Naviglio S.	195	157
Negrone M.	093	106
Nicoli M.	284	203
Nieddu L.	050	82
Nisi L.	027	71
Nitti D.	036	75
Nonnato A.	144	132
Nouvenne A.	250	186
Novarini P.	274	198
Novembrino C.	101	110
Novembrino C.	255	188
Novembrino C.	256	189
Novembrino C.	185	152
Nuccetelli M.	170	145
Obici L.	037	76
Occhiogrosso G.	212	166
Ognibene A.	104	111
Ognibene A.	106	112
Ognibene A.	003	58
Ognibene A.	S2.3	33
Olive R.	216	169
Olivieri O.	189	154
Olivieri O.	182	151
Olivieri O.	114	116
Olivotto F.	187	153
Olivotto F.	198	159
Olivotto F.	200	160
Olivotto F.	001	57
Olivotto I.	047	81
Ollosson R.	234	178
Origone P.	024	69
Orrù S.	024	69
Orsulak P.J.	275	198
Ottomano A.M.	103	111
Ottomano C.	276	199
Pacifici R.	043	79
Pacifici R.	216	169
Pacifici R.	217	169
Padoan A.M.	S6.2	44
Padrini R.	085	102
Paduano M.	032	73
Pagani F.	074	95
Pagani F.	192	156
Pagani F.	206	163
Pagani S.	276	199
Pagano G.	153	136
Pagano M.	195	157
Pagnoni S.	127	123
Palatini O.	187	153
Palatini O.	198	159
Palatini O.	200	160
Palazzo V.	253	187
Palisi A.	119	119
Palla A.	137	128
Palla A.	128	124
Palladini G.	186	153
Pallotti F.	122	121
Pallotti F.	219	170
Pallotti F.	247	184
Pallotti F.	231	176
Pallotti F.	265	193
Palmi I.	043	79
Palmieri D.	160	140
Palmieri D.	012	62
Palmieri G.	049	82
Palmucci Z.	190	155
Palù G.	040	77
Palumbo C.	083	101
Palumbo R.	222	172
Paniccia R.	S2.3	33
Panicucci E.	221	171
Panicucci E.	179	149
Panicucci E.	166	143
Panicucci E.	167	143
Pansini N.	027	71
Pansini N.	193	156
Pansini N.	164	142
Pansini N.	083	101
Pansini N.	168	144
Pansini N.	280	201
Pantaleo A.	235	178
Panteghini M.	074	95
Panteghini M.	220	171
Panteghini M.	192	156
Panteghini M.	206	163
Panzali A.	138	129
Paone A.	222	172
Papa A.	180	150
Paparo F.	160	140
Papini A.	173	146
Papola F.	021	67
Paradisi A.	214	168
Parco S.	S5.5	42
Parri M.S.	201	160
Parri M.S.	263	192
Parri M.S.	264	193
Partenza A.	035	75
Partenza A.	046	80
Pascali J.	272	197
Paschino P.	034	74
Pascual J.A.	216	169
Pascual J.A.	217	169
Pascucci I.	012	62
Pascucci I.	093	106
Pasotti M.	202	161
Pasquali C.	258	190
Pasquali C.	063	89
Pasquino M.T.	006	59
Pasquoni M.L.	053	84
Passalacqua G.	249	185
Passerai S.	239	180
Passerini I.	047	81
Passerini I.	058	86
Passerini R.	237	179
Passi A.	183	151
Passi A.	231	176
Passino C.	175	147
Passino C.	157	138
Passino C.	194	157
Passino C.	S1.3	29
Passoni D.	130	125
Pateri F.	226	174
Patrosso M.	052	83
Patrosso M.C.	023	68
Patrosso M.C.	024	69
Patrucco G.	266	194
Patuzzo R.	229	175
Pauri P.	S1.5	30
Pavan C.	114	116
Pavan I.	144	132
Pavesi F.	086	102
Pavia T.	107	113

AUTORE	COD	PAG
Pavòn M.A.	085	102
Pazzaglia M.	221	171
Pedrazzoli S.	156	138
Pedrazzoli S.	064	89
Pedrazzoli S.	063	89
Pedroni P.	014	63
Pellati D.	015	64
Pellegrini G.	107	113
Pellegrini M.	216	169
Pellegrini M.	217	169
Pellegrini S.	054	84
Pellegrino A.	093	106
Pellu V.	124	122
Pelo E.	038	76
Pelosi P.	247	184
Penco S.	023	68
Penco S.	024	69
Penco S.	052	83
Pennino C.	039	77
Pepe A.	285	203
Pepe G.	249	185
Perego D.	061	88
Peri F.	162	141
Perino M.G.	034	74
Perricone R.	169	144
Perrone B.	265	193
Perrone M.C.	283	202
Perroni L.	052	83
Persichilli S.	154	137
Persichilli S.	225	173
Persichilli S.	214	168
Peruzzi F.	136	128
Peruzzi F.	148	134
Pes G.M.	028	71
Pes G.M.	029	72
Pes G.M.	034	74
Pes G.M.	050	82
Pes G.M.	174	147
Pes G.M.	060	87
Pescaglini M.	053	84
Petrazzini A.	060	87
Petrelli M.C.	280	201
Petricci P.	112	115
Petrigni T.	203	161
Petrone E.	160	140
Petrozzi L.	251	186
Petruzzellis D.	162	141
Petti M.C.	105	112
Pettinato S.	174	147
Pezzati P.	289	206
Pezzati P.	009	61
Pichini S.	216	169
Pichini S.	217	169
Pieraccini L.	041	78
Pieretti B.	197	158
Piersigilli A.	022	68
Pieserico G.	091	105
Pietrini P.	221	171
Pietrini P.	179	149
Pietrini P.	166	143
Pietrini P.	167	143
Pietrini P.	054	84
Pifferi S.	221	171
Pighi P.	061	88
Pignatti P.F.	182	151
Pignero A.	039	77
Pilo A.	S8.4	53
Pilotto A.	246	184
Pilotto A.	250	186
Pilotto A.	254	188
Pilotto A.	257	189
Pinchera A.	129	124
Pinna G.G.	235	178
Pinto P.	277	199
Piozzi E.	023	68
Pirina P.	034	74
Pirrone A.	158	139
Pisani F.	018	66
Pisani F.	105	112
Pittoni M.	184	152
Pitto M.	224	173
Piva E.	100	109
Piva E.	110	114
Piva E.	115	117
Pizzolo F.	189	154
Pizzolo F.	182	151
Plebani M	156	138
Plebani M.	S5.7	43
Plebani M.	073	95
Plebani M.	188	154
Plebani M.	100	109
Plebani M.	242	182
Plebani M.	243	182
Plebani M.	074	95
Plebani M.	030	72
Plebani M.	078	98
Plebani M.	246	184
Plebani M.	184	152
Plebani M.	S2.1	31
Plebani M.	084	101
Plebani M.	036	75
Plebani M.	090	104
Plebani M.	248	185
Plebani M.	250	186
Plebani M.	140	130
Plebani M.	110	114
Plebani M.	079	98
Plebani M.	085	102
Plebani M.	227	174
Plebani M.	199	159
Plebani M.	115	117
Plebani M.	259	190
Plebani M.	260	194
Plebani M.	149	134
Plebani M.	064	89
Plebani M.	077	97
Plebani M.	204	162
Plebani M.	233	177
Plebani M.	080	99
Plebani M.	091	105
Plebani M.	063	89
Pocchiari M.	S7.3	49
Pocchiari M.	LP3	47
Poffe R.	189	154
Poggesi M.	271	196
Poggesi M.	003	58
Poggesi M.	082	100
Poletti R.	S1.3	29
Poli G.	111	115
Poli G.	114	116
Polizzotto A.	118	118
Poma F.	057	86
Poma F.	062	88
Ponchia S.	140	130
Ponchia S.	227	174
Ponchia S.	149	134
Ponchia S.	233	177
Pontillo M.	132	126
Porta P.	144	132
Postiglione L.	161	140
Postiglione L.	171	145
Pozzobon C.	125	122
Prati P.	196	158
Prati P.	201	160
Previtali G.	292	207
Primignani P.	052	83
Prisco D.	S2.3	33
Procida E.	209	164
Prontera C.	196	158
Prontera C.	S1.3	29
Puccetti C.	221	171
Puccetti C.	179	149
Puccetti C.	166	143
Pucci P.	104	111
Quaranta M.	162	141
Rabottini S.	162	141
Radaelli A.	276	199
Radi B.	244	183
Radi B.	252	187
Raffaelli N.	053	84
Raho M.	S6.1	44
Raimondo F.	224	173
Rampinini F.	S4.3	37
Rampinini F.	282	202
Ranieri P.	066	90
Rapanotti C.	170	145
Rapi S.	271	196
Rapi S.	003	58

AUTORE	COD	PAG
Rapi S.	082	100
Razzano C.	128	124
Re G.	262	192
Rega C.	032	73
Regazzi Bonora M.	139	129
Repetto I.	178	149
Restagno G.	025	70
Restagno G.	031	73
Restagno G.	119	119
Rettondini M.	090	104
Ricci L.	S1.5	30
Ricciardone M.	171	145
Ricetti M.M.	111	115
Riggi L.	200	160
Righetti G.	229	175
Rinaldi G.	113	116
Rinnovati A.	038	76
Riolfi P.	111	115
Ripari A.	207	163
Risitano A.	181	150
Rizza A.	051	83
Rizzardi S.	278	200
Rizzardi S.	008	60
Rizzotti P.	088	103
Rizzotti P.	284	203
Roazzi P.	006	59
Rocchetti S.	240	181
Rocchetti S.	290	206
Rocchetti S.	236	179
Rocchi A.	096	107
Rocchi A.	187	153
Rocchi A.	198	159
Rocchi A.	200	160
Rocchi A.	001	57
Rocchi M.	197	158
Rocino A.	020	67
Romagnoli C.	240	181
Roman D.	072	94
Romanelli A.	107	113
Romano C.	S6.3	45
Romano M.	195	157
Romano V.	078	98
Romano V.	277	199
Romano V.	080	99
Roncada T.	187	153
Roncada T.	198	159
Roncada T.	200	160
Roncada T.	001	57
Roncoroni G.	078	98
Roncoroni G.	079	98
Roncoroni G.	077	97
Roncoroni G.	080	99
Rondanelli M.	238	180
Rosati G.	241	181
Rosato V.	193	156
Rosina M.	185	152
Rossi A.	130	125
Rossi C.	108	113
Rossi C.	117	118
Rossi C.	205	162
Rossi F.	144	132
Rossi G.	258	190
Rossi L.	239	180
Rossi L.	245	183
Rossi R.	035	75
Rossi R.	165	142
Rossi R.	046	80
Rosso R.	078	98
Rosso R.	079	98
Rosso R.	077	97
Rosso R.	080	99
Rubatti C.	095	107
Rubeca T.	210	165
Ruffini I.	209	164
Rufo A.	021	67
Rugge M.	242	182
Rugge M.	243	182
Rugge M.	036	75
Rugge M.	259	190
Ruggieri N.	212	166
Ruocco L.	107	113
Russi E.G.	135	127
Russo A.	165	142
Russo G.	112	115
Russo M.	181	150
Russo P.	198	159
Russo Volpe S.	238	180
Sabatini L.	053	84
Sabatini M.	112	115
Sacchetti L.	160	140
Sacchetti L.	142	131
Sacchetti L.	093	106
Saggiorato G.	015	64
Saia A.	203	161
Salati A.	106	112
Salati A.	230	176
Salerno G.	160	140
Salonia A.	132	126
Salti S.	003	58
Salti S.	S2.3	33
Salvagno G.L.	111	115
Salvagno G.L.	114	116
Salvati A.M.	006	59
Salvati A.M.	116	117
Salvatici M.	237	179
Salvatore F.	020	67
Salvatore F.	039	77
Salvatore F.	LP2	35
Salvatore F.	044	79
Salvatore S.	262	192
Salvemini L.	269	195
Salvia M.	069	92
Salviato R.	020	67
Sandri M.	182	151
Sandri M.T.	237	179
Sangiorgi Z.	092	105
Sanna A.	S3.1	34
Sanpietro F.	065	90
Sanpietro F.	071	94
Santambrogio M.	145	132
Santini G.	011	62
Santini S.A.	240	181
Santini S.A.	121	120
Santonocito C.	240	181
Sanzari M.	110	114
Sanzari M.C.	156	138
Sardone V.	066	90
Sarto C.	224	173
Sartorato P.	120	119
Sartori M.T.	015	64
Sarzi Amadè A.	008	60
Savini F.	213	166
Savino A.	292	207
Savino L.	102	110
Savonitto M.M.	215	168
Sbolci V.	230	176
Sbrana S.	263	192
Sbrozzi D.	113	116
Scagliola P.	123	121
Scagliola P.	127	123
Scalise G.	244	183
Scalise G.	252	187
Scarati S.	010	61
Scarpini E.	256	189
Scatena R.	108	113
Scatena R.	117	118
Scatena R.	205	162
Scazzone C.	203	161
Schena F.P.	066	90
Schiavon E.	S6.1	44
Schiavone R.	108	113
Schiavone R.	117	118
Schinella M.	078	98
Schinella M.	079	98
Schinella M.	007	60
Schinella M.	077	97
Schinella M.	080	99
Sciacovelli L.	073	95
Sciacovelli L.	074	95
Sciacovelli L.	084	101
Sciacovelli L.	090	104
Sciacovelli L.	091	105
Scoditti U.	165	142
Scognamiglio A.	277	199
Scognamiglio D.	039	77
Scordo M.G.	043	79

AUTORE	COD	PAG
Scribano D.	154	137
Scribano D.	225	173
Scribano D.	214	168
Scutellà M.	286	204
Secchiero S.	073	95
Secchiero S.	084	101
Secchiero S.	090	104
Sechi G.P.	241	181
Sedita A.	025	70
Sedita A.	031	73
Segura J.	216	169
Segura. J.	217	169
Semprini B.	136	128
Semprini B.	148	134
Seregni E.	122	121
Seregni E.	265	193
Serva P.	121	120
Sessa A.	181	150
Sessa M.	068	91
Sesti G.	097	108
Sibille T.	124	122
Sica A.	253	187
Siciliano G.	024	69
Signò P.	270	196
Signò P.	273	197
Signorini S.	061	88
Silvestri C.	244	183
Silvestri C.	252	187
Simonini N.	223	172
Sini M.E.	029	72
Sodi A.C.	058	86
Solaro M.	125	122
Soldani G.	291	207
Soldati M.	088	103
Soriani N.	S4.2	37
Sorrentino A.	195	157
Sorrentino F.	006	59
Sotgia S.	141	130
Sotgia S.	261	191
Spaccavento M.	S6.4	46
Spaccini L.	052	83
Spada P.	108	113
Spada P.	117	118
Specchia I.	083	101
Sperti C.	063	89
Spiezia L.	015	64
Spiller D.	291	207
Spina A.	195	157
Spina E.	043	79
Spinella P.	S5.4	41
Spreafico F.	122	121
Stefani A.L.	040	77
Stefani N.	250	186
Stefanin C.	S4.3	37
Stefanin C.	282	202
Stefini F.	192	156
Stefini F.	206	163
Stigliano M.A.	173	146
Stocchi O.	208	164
Storti S.	196	158
Storti S.	S1.3	29
Storti S.	201	160
Storti S.	055	85
Storti S.	264	193
Strusi P.	075	96
Suardi S.	258	190
Suigo E.	078	98
Suigo E.	079	98
Suigo E.	077	97
Suigo E.	080	99
Tagariello G.	020	67
Tagliaferri A.	068	91
Tagliaro F.	134	127
Tagliavini F.	258	190
Tamaro G.	S5.5	42
Tampoia M.	164	142
Tampoia M.	168	144
Tampoia M.	280	201
Tamponi A.	174	147
Tani M.	014	63
Tappi A.	133	126
Tappi A.	269	195
Tappi C.	133	126
Tarantini L.	187	153
Tarantini L.	198	159
Tarantini L.	200	160
Targioni G.	003	58
Targioni G.	S2.3	33
Taricco E.	135	127
Tarzia A.	116	117
Tavazzi L.	202	161
Tebaldini O.	057	86
Tebaldini O.	062	88
Temporin V.	100	109
Temporin V.	110	114
Temporin V.	115	117
Teresi S.	158	139
Terreni A.	104	111
Terreni A.	106	112
Terreni A.	230	176
Terrin G.	044	79
Tessier R.	187	153
Tinazzi E.	189	154
Tirelli A.S.	096	107
Tocchini G.	244	183
Tocchini M.	075	96
Tocchini M.	252	187
Tocchio A.	001	57
Tomasicchio L.	027	71
Tommasoli R.M.	114	116
Tonini A.	185	152
Tonini G.	S5.5	42
Torboli M.	007	60
Torelli A.	095	107
Toriello M.	142	131
Torresani E.	096	107
Torri C.	279	200
Torricelli F.	038	76
Torricelli F.	047	81
Torricelli F.	058	86
Tosetti C.	134	127
Trabetti E.	182	151
Tranquillo M.	S1.5	30
Trapani M.R.	069	92
Trenti T.	S1.5	30
Trenti T.	279	200
Trenti T.	009	61
Trenti T.	146	133
Trenti T.	S1.2	28
Tresca E.	190	155
Trettene M.	134	127
Trettene M.	272	197
Trevenzoli G	048	81
Trevisan M. T.	134	127
Tringali C.	238	180
Troccoli G.	212	166
Troccoli V.	212	166
Troglia G.	070	93
Troiano S.	162	141
Tronchin M.	003	58
Tronchin M.	S2.3	33
Troncone R.	160	140
Tucci A.	286	204
Tucci E.	209	164
Tura M.	136	128
Tura M.	148	134
Turchi S.	175	147
Turchi S.	S1.3	29
Turconi P.	057	86
Turconi P.	062	88
Turri O.	042	78
Tusa G.	069	92
Ungari S.	135	127
Urbano P.	S1.5	30
Ursicino N.	078	98
Ursicino N.	087	103
Ursicino N.	079	98
Ursicino N.	077	97
Ursicino N.	080	99
Urso M	098	108
Urso V.	237	179
Usai M.F.	141	130
Usai M.F.	261	191
Usiglio D.	288	205
Vadacca G.B.	202	161
Vairo S.	128	124
Valanzano A.	S7.3	49
Valentini A.	007	60

AUTORE	COD	PAG
Valentini M.	113	116
Valentino P.	193	156
Valsecchi C.	224	173
Valverde S.	098	108
Valverde S.	099	109
Vanni C.	S6.3	45
Varagnolo M.	227	174
Varagnolo M.	233	177
Vargiu D.	047	81
Varraso L.	193	156
Varraso L.	168	144
Varriale G.	032	73
Vascotto L.	S1.4	30
Vassalle C.	251	186
Veccia S.	244	183
Veccia S.	252	187
Venerando B.	238	180
Venerito M.	246	184
Vento G.	240	181
Ventura R.	216	169
Ventura R.	217	169
Venturi C.	017	65
Venturi C.	041	78
Venturini R.	078	98
Venturini R.	079	98
Venturini R.	077	97
Venturini R.	080	99
Vergoni W.	017	65
Verna A.	168	144
Vertullo C.	093	106
Vescia S.	008	60
Vigetti D.	231	176
Villani A.	286	204
Vinai E.	070	93
Vinci E.	109	114
Viola M.	231	176
Vitale A.	127	123
Vitale G.	069	92
Vitale R.L.	022	68
Vitale R.L.	157	138
Vitale R.L.	126	123
Vitelli G.	105	112
Vittorini S.	201	160
Vocca L.	203	161
Vona R.	105	112
Vulpio C.	108	113
Vulpio C.	117	118
Wierer B.	078	98
Wierer B.	079	98
Wierer B.	077	97
Wierer B.	080	99
Wilkens M.	S3.2	34
Zabeo M.	159	139
Zagarella R.	121	120
Zambon C.F.	063	89
Zambon C.-F.	156	138
Zambon C.-F.	036	75
Zambon C.-F.	064	89
Zanazzi M.	267	194
Zaninotto M.	188	154
Zaninotto M.	074	95
Zaninotto M.	184	152
Zaninotto M.	227	174
Zaninotto M.	199	159
Zaninotto M.	204	162
Zaninotto M.	233	177
Zanni G.	132	126
Zanusso G.	S7.1	48
Zappacosta B.	154	137
Zappacosta B.	225	173
Zappacosta B.	214	168
Zardo L.	073	95
Zardo L.	084	101
Zardo L.	090	104
Zarrilli F.	160	140
Zecchin B.	S5.4	41
Zepponi E.	078	98
Zepponi E.	079	98
Zepponi E.	077	97
Zepponi E.	080	99
Zinellu A.	141	130
Zinellu A.	261	191
Zini G.	287	205
Zoppè M.	095	107
Zoppi F.	139	129
Zoppi F.	150	135
Zorzino L.	237	179
Zucano A.	164	142
Zucca G.	241	181
Zuccaro P.	043	79
Zuccaro P.	216	169
Zuccaro P.	217	169
Zucchelli G.C.	175	147
Zucchelli G.C.	211	165
Zucchelli G.C.	196	158
Zucchelli G.C.	251	186
Zucchelli G.C.	180	150
Zucchelli G.C.	S1.3	29
Zucchelli G.C.	S8.4	53
Zuppi C.	121	120
Zuppi C.	236	179
Zyw L.	S1.3	29

AUTORE	COD	PAG