
ABSTRACT POSTER

Martedì 12 giugno 2001

■ Poster 001 - 100

Mercoledì 13 giugno 2001

■ Poster 101 - 194

SVILUPPO ED APPLICAZIONE DI UN SOFTWARE PER LA GESTIONE DELLA MANUTENZIONE E TARATURA DEGLI STRUMENTI

Cremaschi A.*, Possenti R.**

* Ufficio Qualità, ** Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Treviglio, P.le Ospedale 1, Treviglio (BG)

INTRODUZIONE: L'applicazione del Sistema Qualità secondo la normativa ISO 9002 richiede di dare evidenza delle manutenzioni/tarature effettuate sulle apparecchiature presenti in Laboratorio (Cap. 11 della norma). La numerosità delle apparecchiature esistenti in un Laboratorio Analisi, la necessità di trasferire tale registrazione anche ad altre UUOO del progetto di Certificazione aziendale, impongono l'urgenza di automatizzare e sistematizzare i controlli attraverso l'implementazione di un software di gestione specifico.

SCOPO: Scopo del presente lavoro è la presentazione delle fasi di sviluppo ed applicazione di un software home-made per la gestione del controllo delle manutenzioni, tarature e della sicurezza elettrica delle apparecchiature di Laboratorio, e la sua esportazione a tutte le UUOO del progetto di Certificazione aziendale.

MATERIALI E METODI: È stato utilizzato un programma funzionante in ambiente Windows, caricato su tutti i PC che gestiscono le apparecchiature, o sul PC presente nella stanza di lavoro, normalmente utilizzato in rete per le applicazioni routinarie.

RISULTATI: L'esame della Procedura Generale del Cap. 11, Controllo delle apparecchiature, proposta dall'Ufficio Qualità per il progetto di Certificazione aziendale, ha innescato una fase di sperimentazione presso il Laboratorio Analisi per lo studio di un SW applicativo dei requisiti richiesti dalla normativa. L'idea di rendere automatizzato il sistema di registrazione della manutenzione giornaliera ha dato origine ad un primo SW, che ha dimostrato la sua praticità per il fatto di essere applicato sul PC in uso presso la sezione o collegato all'apparecchiatura. All'avvio il SW presenta automaticamente le manutenzioni in scadenza nella giornata, siano esse giornaliere piuttosto che settimanali o mensili, ed è prevista la stampa del report giornaliero delle attività svolte. I primi risultati soddisfacenti hanno permesso, attraverso la stretta collaborazione del Laboratorio con l'Ufficio Qualità, di perfezionare il SW, aggiungendo lo sviluppo della Scheda dell'Apparecchiatura, che riporta la situazione per quanto concerne il controllo della taratura, della sicurezza elettrica, del controllo funzionale, e la manutenzione programmata.

CONCLUSIONI: L'applicazione di tale SW in Laboratorio ha consentito il perfezionamento della Procedura Generale del Cap. 11, in maniera tale da renderla operativa anche presso le altre UUOO concorrenti alla Certificazione. Si è sviluppata una proficua attività di gruppo nell'ambito dell'organigramma del SQA, che ha portato ad individuare nel referente della manutenzione del Laboratorio il referente aziendale per il controllo delle apparecchiature, con compiti applicativi presso le UUOO in via di Certificazione.

MONITORAGGIO INFORMATIZZATO DEL TAT AL SETTORE URGENZE

Carbonieri A., Casolari M.C., Tizzanini W.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche
Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena
via del Pozzo 71, 41100 Modena (Italia)

La riduzione dei tempi di risposta è uno degli obiettivi che in questi anni hanno monopolizzato le energie dei Laboratori: è infatti importante fornire risultati affidabili, ma è anche indispensabile che la risposta arrivi in un tempo congruo per attivare quanto prima l'intervento terapeutico e ridurre i tempi della degenza.

La informatizzazione del settore urgenze del Laboratorio Analisi Chimico Cliniche del Policlinico di Modena è stata portata avanti anche allo scopo di rispondere alla esigenza dei reparti di disporre dei risultati del laboratorio in tempi sempre più brevi.

Le tappe più significative sono state:

- scheda ottica per la prenotazione automatica;
- collegamento bidirezionale di tutti gli strumenti;
- adozione del bar-code per l'identificazione positiva dei campioni;
- invio in posta elettronica dei referti validati.

Si è potuto in questo modo garantire ai reparti nello standard di prodotto un tempo massimo di risposta che va da 2 ore per l'intervallo 8-10 e di 1 ora per il resto della giornata. Il Pronto Soccorso ha un percorso prioritario e un tempo medio di risposta di 40 minuti.

Il sistema informatizzato ha consentito inoltre di attivare un monitoraggio in tempo reale di tutti i casi che superano il tempo massimo che il laboratorio si è dato per fornire le risposte, in modo da svolgere verifiche e prendere provvedimenti tempestivi sui campioni ritardatari. La registrazione dei dati della giornata consente infine un monitoraggio a posteriori attraverso la stampa di riepiloghi che presentano: numero di richieste, TAT (minimo, massimo e medio), così come si sono succeduti nell'arco delle 24 ore.

Per le elaborazioni possono essere selezionati il giorno, il periodo e il reparto richiedente. In ciascun report, nel caso in cui si sia superato il tempo di risposta garantito nello standard di prodotto, vengono segnalati anche i numeri di richiesta sui quali si è determinata l'eccezione per potere svolgere una analisi sulle cause che hanno determinato il ritardo.

La stampa sistematica di questi reports si è rivelata uno strumento prezioso per:

- monitoraggio del TAT e attivazione di A.C.;
- valutazione dei carichi di lavoro per la distribuzione del personale in rapporto ai picchi di attività;
- analisi del comportamento e delle esigenze dei reparti

Bibliografia:

Timeliness of clinical laboratory tests. A discussion based on five CAP Q-probe studies.

Steindel-SJ/Arch-Pathol-Med.1995 Oct;119(10);918-23

IL LABORATORIO NELLA RETE - I SITI WEB DEI LABORATORI D'ANALISI DEL DISTR.¹⁰ 48 E DEL SER.²¹⁰ VIROLOGIA DEL P.O. "ASCALESI" DELL'A.S.L. NA 1

Terracciano N., *Corsi G., Alterio A., Falco E., Scancariello G., *De Rosa P., Maiorano G., *Moro A.R., Smeraglia R., *Spiteri D.

A.S.L. NA 1 P.O. "Ascalesi" – Serv.²¹⁰ Virologia – Prim.¹⁰: Prof. R. Smeraglia - *Distr.¹⁰ 48 Lab.¹⁰ d'analisi Chimico-cliniche e microbiologiche Dir.¹⁰: dr D. Spiteri

Premessa:

Nelle A.S.L., il laboratorio di analisi perde di visibilità nei riguardi dei *clienti*. Portiamo, tramite il computer su Internet, le notizie del laboratorio d'analisi, emergendo, così, dal groviglio istituzionale. Internet è una rete di oltre 25.000 network, connessi volontariamente appartenenti ad Università, aziende, istituzioni governative ed altre organizzazioni. Centinaia di archivi forniscono informazioni che coprono ogni immaginabile curiosità. Grazie ad Internet, si può raggiungere una vasta platea di utenti ed incrementare la propria visibilità. La *home page* è la pagina da cui si inizia ad accedere alle informazioni che si desiderano. Le pagine Web hanno un *Universal Resource Locator* (URL indirizzo unico per ogni documento sul Web) e sono scritte usando un linguaggio detto *Hypertext Markup Language* (HTML).

Materiali, metodi e tecniche:

I siti Web possono essere elaborati disponendo di un programma di video-scrittura, es. WordPad™ e un programma di elaborazione d'immagini, una connessione ad Internet per ottenere dai *Provider* spazi gratuiti per la pubblicazione dei siti Web ed infine la conoscenza del linguaggio HTML. Con riguardo alle norme APL, abbiamo previsto d'inserire i seguenti link assoluti e relativi:

Distr. 48 e Ser. Virologia: le unità operative e i servizi;

Chi siamo: l'organigramma dei due laboratori;

Come Raggiungerci: le mappe, i mezzi pubblici per raggiungere i laboratori;

Orario di Attività: attività e consegna referti;

Notizie utili: la prassi, il numero di analisi consentito;

Consigli e precauzioni: la raccolta dei liquidi biologici, le analisi praticate;

Referti on line: i referti tramite adeguata individuazione del personale abilitato o dell'utente;

Domande frequenti: i dubbi dell'utente/cliente;

Link Utili: in rete;

Segnalazioni: e-mail per i referenti dei laboratori.

Conclusioni:

Le informazioni, la prassi da seguire per le varie attività fornite sono una forma di *client care*, che consentono l'innalzamento del livello di qualità dei servizi offerti.

Rif. Bibliografici:

Cianflone M., Forquet F. (2000), *Il lavoro Web*, Milano Il Sole 24 ore Media e Impresa S.p.A.

UTILIZZO DI ACCESS 2000 NEI DOSAGGI IN HPLC DI FARMACI E DROGHE D'ABUSO

Cangiano G.¹, D'Amora M.², Ingala F.³, Vrenna L.¹

Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1): ¹Dipart. Farmacodipendenze – Polo Laboratoristico P.O. "C.Ascalesi"; ²Referente Laborat. Analisi - Direz. Generale; ³Laborat. Patologia Clinica P.O. "C.Ascalesi"

L'utilizzo della nuova versione di Microsoft Access, distribuita insieme con Office 2000, ha reso più agevole la gestione dei dosaggi urinari di farmaci e droghe d'abuso effettuati in HPLC con prodotti e strumenti della ditta Biorad. Il data-base da noi progettato è costituito da tabelle pazienti, reparti, farmaci, grafici, valori esami e note aggiuntive di refertazione.

Tutte queste tabelle sono poi congiunte (query) ad un'unica grande tabella esami dove ogni record rappresenta un campione di urine afferente al nostro Polo Tossicologico di riferimento. Sono state costruite maschere facilitanti l'inserimento ordinato dei dati nelle tabelle, l'attivazione di funzioni filtro e selezione e la visualizzazione di eventuali documenti grafici.

Si è preferita la modalità tabellare per inserire i farmaci identificati e le relative concentrazioni, in modo da avere una visione di insieme delle numerose sostanze riscontrate in un unico campione di urina. Vengono incamerate droghe e benzodiazepine, nell'ordine sopra citato ed, a seconda dei rapporti dei tempi di ritenzione crescenti e riferiti ai rispettivi standard interni primari (N-etil nordiazepam per l'opzione droghe e triazolam per l'opzione benzodiazepine). La visualizzazione e le stampe delle relazioni permettono di ottenere fogli di lavoro, fogli per archiviazione, stampe di referti semplici e complessi (con grafici, in formato bitmap, ottenuto dopo scannerizzazione e salvataggio in una cartella di Documenti) e stampa di etichette per provette. Ogni referto sarà provvisto di note indicative sulle eventuali adulterazioni dell'urina o provenienza dei cataboliti e sulle eventuali ulteriori procedure metodologiche (es., estrazione del metadone, idrolisi dei glucuronidi, ecc.) utilizzate per l'identificazione della sostanza. Il referto ad uso medico-legale sarà comprensivo di grafico (differenziato per droghe e benzodiazepine) completo di picchi di ritenzione. La positività per cannabinoidi verrà evidenziata con un referto in cui è presente sia il grafico del campione che quello del calibratore (85 ng/ml). Il software può essere impiegato anche per effettuare ricerche temporali su Pazienti e mirate ad evidenziare escrezioni di alcuni cataboliti (es. metadone ed EDDP correlati al dosaggio della creatinina). Una semplice rilegatrice a spirale permetterà l'assemblaggio dei fogli riepilogativi e quindi la creazione di un registro-archivio. E' possibile unire i dati cromatografici con quelli immunoenzimatici gestiti col software della ditta Dade-Behring grazie ad un numero identificativo del campione di urina.

Prague C.N.; Irwin M.R. Microsoft Access 2000. Editrice Tecniche nuove, 1999

GESTIONE INTEGRATA DEL CONTROLLO ANALITICO DI QUALITÀ: STATO DELL'ARTE IN PIEMONTE

SIBioC Sezione Piemonte – Gruppo di Lavoro “Sistema informatico gestionale di Laboratorio”: Patrucco G.¹, Bertone C.², Trucco G.³, Aroasio E.⁴, Gueli S.⁵, Tinivella A.⁵

¹Ospedale S. Andrea di Vercelli ASL 11; ²Ospedale di Chieri ASL 8; ³Ospedale Evangelico Valdese di Torino ⁴A.O. S. Luigi Orbassano (TO); Ospedale Civile di Arona ASL 13

Scopi/obiettivi: L'attivazione di programmi di controllo di qualità interno (CQI) è ormai condizione obbligatoria, in ottemperanza sia alle norme legislative nazionali e regionali sia ai suggerimenti delle società scientifiche. Pur essendo il livello di informatizzazione dei laboratori ampiamente soddisfacente, il CQI continua spesso ad essere gestito separatamente dal sistema centrale. Gli obiettivi di questo lavoro erano verificare lo stato dell'arte a livello regionale e avviare con i fornitori disponibili un progetto di sperimentazione in quest'ambito.

Metodologia:

a. Come prima fase del lavoro è stata effettuata un'indagine regionale per verificare la presenza e l'utilizzo di eventuali programmi di CQI integrati nel sistema informatico gestionale, tramite questionari ed interviste telefoniche.
b. Sono stati quindi individuati i criteri necessari affinché un programma di CQI integrato nel sistema di gestione risulti efficace; essi rappresentano i requisiti minimi necessari ad un adeguato funzionamento del software di gestione nel rispetto dei requisiti necessari ad un sistema qualità.

c. La lista di riscontro così costruita è stata utilizzata per verificare i sistemi informatici in uso e per avviare un possibile intervento di miglioramento con i fornitori disponibili.

Risultati: Su 40 laboratori piemontesi intervistati solo 4 dichiarano di utilizzare in via sperimentale e/o parziale il software del sistema centrale; il 10% ne dichiara la disponibilità ma non lo usa e l'80% afferma di non averne la disponibilità. I tre principali fornitori, che coprono insieme circa il 70% del mercato, offrono soluzioni fortemente parziali rispetto ai requisiti minimi identificati. Due di essi hanno avviato una sperimentazione in differenti laboratori allo scopo di migliorare le caratteristiche operative del software.

Considerazioni conclusive: La gestione del CQI integrata con il sistema informatico centrale facilita l'elaborazione complessiva permettendo la creazione di indicatori che possono essere costruiti in funzione delle specifiche necessità del laboratorio, essenziali per un adeguato monitoraggio del sistema qualità del servizio.

Bibliografia: Regione Piemonte DCR 22.2.2000/616 – 3149: Disposizioni di attuazione del DPR 14.1.97 (Accreditamento Istituzionale)

LA REALTÀ DEL SISTEMA INFORMatico DEI LABORATORI DELLA AUSL3 GENOVESE: SPERIMENTAZIONI ED OBIETTIVI

Ghiara F., Perrone M.C., Bottaro L.*, Bambara G.**

Lab. Analisi Osp. Nervi DiPaC-Genova

*Lab. Analisi Via Piacenza DiPaC-Genova

**DATASIEL-Genova

Il DiPaC della AUSL3 è composto da 8 Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche e da 1 di Anatomia Patologica. I Laboratori sono dotati di un unico tipo di programma di Gestione: Delphi (Dasit).

E' stato scelto un sistema informatico comune per tutti i Servizi, allo scopo di uniformare le varie procedure delle fasi pre- e post-analitiche, che sono quelle che determinano un anomalo allungamento dei tempi che intercorrono tra la prenotazione di un accertamento di Laboratorio e la consegna dei relativi esiti. Tenuto presente che la parte analitica nel circa 80% dei casi viene eseguita in giornata, non si spiegavano infatti i lunghi tempi (anche oltre 7 giorni lavorativi) per la consegna dei referti.

Il primo passo è stato di costruire i vari database dei Laboratori con un campo in comune, il codice del Decreto Ministeriale. Ciò ha permesso di ottenere un protocollo di trasmissione dati tra il CUP e il programma di gestione dei singoli Laboratori, con il passaggio dei dati anagrafici e dell'elenco delle richieste dai vari CUP ai singoli Laboratori a loro collegati con un'unica rete informatica.

L'utilizzo di codici a barre ha facilitato enormemente i processi di lavoro, diminuendo il turn around-time e gli errori umani. Per la validazione automatica dei risultati con una ulteriore diminuzione del turn around-time sono state impiegate idonee formule, atte a funzionare come un abbozzo di Intelligenza Artificiale, per il controllo degli esiti in rapporto ai parametri soglia, in modo da bloccare risultati, che non soddisfino le regole imposte.

Il passo successivo, che è stato preventivato in tempi brevi dall' Azienda, sarà costituito dalla possibilità di prenotazione diretta degli esami di Laboratorio da parte dei medici di base e da parte degli utenti presso farmacie convenzionate. La refertazione per punti prelievi o reparti agevola l'invio dei referti ai vari richiedenti. Un progetto futuro prevede l'invio dei referti utilizzando o la rete informatica (per i reparti di degenza) o la linea telefonica per inoltrare fax con risultati particolari (ad esempio monitoraggio terapia) ai medici di famiglia, a farmacie convenzionate ecc.

Clin Chem Lab Med 1999; 37: 711-717.

VALUTAZIONE DELLA PRATICABILITÀ DEL SISTEMA ANALITICO BAYER ADVIA 1650

Crippa A., Ottomano C., Parimbelli M.

Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedali Riuniti di Bergamo

Il giudizio sulla validità di un sistema analitico si basa sull'attendibilità analitica, sul rapporto costo-beneficio e sulla praticabilità d'uso. Quest'ultima caratteristica di praticabilità, ovvero l'insieme delle proprietà che riguardano aspetti quali l'installazione, il flusso di lavoro, il controllo di qualità, la risoluzione dei problemi e la versatilità, assume sempre maggior importanza nelle scelte organizzative del laboratorio clinico in quanto ne influenza notevolmente la funzionalità.

Scopo del presente studio è stato il riesame, dopo tre anni di esperienza lavorativa, della praticabilità del sistema analitico di chimica clinica Bayer ADVIA 1650.

Per la valutazione delle caratteristiche di praticabilità è stato utilizzato il questionario proposto da W. Stockmann et al. (*Criteria of Practicability. In Evaluation Methods in Laboratory Medicine. Ed. VCH 1993; p 185-201*), che esamina circa 200 attributi di un analizzatore suddivisi per gruppi e li quantifica in maniera standardizzata attraverso l'assegnazione di un punteggio.

Risultati - l'intervallo dei punteggi assegnati a ciascun gruppo di attributi cade tra l'area "soddisfa i requisiti" e l'area "eccede i requisiti". Tra le caratteristiche più apprezzate si sono rilevate: la processazione del campione, il trattamento del reagente, i tempi di processo, il monitoraggio delle funzioni, l'elaborazione dei dati, la versatilità e la manutenzione; gruppi di caratteristiche che in buona misura sottendono all'area "organizzazione del lavoro".

In conclusione l'alto grado di praticabilità riscontrato con l'analizzatore Bayer ADVIA 1650 ha semplificato il nostro flusso di lavoro migliorandone la produttività e l'efficacia analitica riducendo, in ultima analisi, i costi di gestione.

AUTOMAZIONE DELLA FASE PREANALITICA

Rossi L., Lucchetti A., Pisaturo F., Paolilli O., Birindelli S., Innocenti B.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche I, Azienda Ospedaliera Pisana - Pisa

L'obiettivo principale della nostra valutazione è di verificare l'effettiva rispondenza alle esigenze del laboratorio di un sistema di gestione e trattamento dei campioni nell'ambito del più ampio contesto della fase preanalitica. Abbiamo adottato, per un periodo di prova, un sistema Roche che gestisce economicamente, con sicurezza ed efficienza, le fasi critiche del processo preanalitico. Il sistema PSD1 + VSII prevede: accettazione del campione (check-in) con sistema PSM; decapping dello stesso (sia per tappi a vite che a pressione) e ordinamento; identificazione positiva del barcode; aliquotazione (250 aliquote l'ora); etichettatura delle provette figlie; smistamento dei tubi secondari nei racks destinati ai diversi analizzatori; utilizzo di puntali monouso, nessun carry-over, pre-trattamento del campione. Ferma restando la decisione di limitare questa esperienza alla cosiddetta "area siero" (decisione obbligata alla luce della mancanza di una valida procedura di identificazione di provette destinate a settori di lavoro diversi: chimica clinica, ematologia, coagulazione, urine, ecc...) con l'impiego dei sistemi PSD1 e VSII è sicuramente possibile verificare e quantificare: la riduzione del numero di provette di prelievo (per la sola area-siero si può passare da 5 ad 1 provetta al massimo); la più razionale utilizzazione del personale, sia tecnico che di supporto, svincolato da operazioni puramente manuali; la migliore qualità del servizio in termini di verifica in tempo reale delle "non conformità" di prelievo (check in) con loro tempestiva segnalazione ai reparti (con conseguente e progressiva riduzione); riduzione dei tempi operativi complessivi, con ulteriore abbassamento del TAT e auspicabile diminuzione delle molte richieste d'urgenza che possono essere soddisfatte da referti routinari in tempi rapidi; il miglioramento delle condizioni di sicurezza del personale esposto ad alto rischio, soprattutto nelle fasi di centrifugazione, sieraggio, aliquotatura e manipolazione dei campioni in genere, l'effetto dei costi di esercizio non solo del laboratorio (miglior utilizzo delle risorse umane) ma del processo assistenziale nel suo complesso (ricaduta positiva sul processo decisionale clinico, con terapie più tempestive e mirate e, se possibile, degenze più brevi). Nel nostro laboratorio si è cercato di consolidare un numero maggiore di esami su un minor numero possibile di analizzatori. In particolare, con il sistema Modular Roche, abbiamo riunito parametri di chimica clinica classica con le plasmaproteine (precedentemente eseguite con metodi nefelometrici), esami della piccola routine (acidi biliari, lipasi, fruttosamina, aldolasi), farmaci e droghe. Tutte queste premesse hanno trovato un ampio riscontro nella realtà operativa del laboratorio, che vedrà ulteriormente confermato il suo ruolo di servizi essenziale e spesso trainante all'interno delle Aziende Sanitarie.

CORRELAZIONI METODOLOGICHE DI DUE ANALIZZATORI EMATOLOGICI NELLA CONTA RETICOLOCITARIA QUANTITATIVA E QUALITATIVA

Mileti A., Lovero R., Brescia V., Palumbo C., Pansini N.

U.O Patologia Clinica I – Azienda Policlinico Consorziale, Bari

La valutazione dell'attività eritropoietica midollare è clinicamente utile nella diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti con anemia sideropenica. La diagnostica di laboratorio permette di valutare parametri classici eritrocitari (Hb, HCT, RBC, MCV, RDW) e parametri espressione di attività eritropoietica cellulare (reticolociti nelle differenti classi maturative).

Scopo del lavoro: è stato di valutare le correlazioni tra due analizzatori ematologici relativamente al conteggio reticolocitario e agli indici di maturazione dei reticolociti in soggetti normali e in pazienti sideropenici.

Materiali e metodi: sono stati analizzati n°51 campioni di soggetti sani e 28 campioni di soggetti sideropenici non trattati afferenti al nostro ambulatorio. Gli analizzatori ematologici, per i reticolociti utilizzano:

- 1) Sysmex SE – 9000: citometria a flusso con l'impiego di l'Auramina per l'RNA reticolocitario.
- 2) Coulter GENS: citometria a flusso con l'impiego di nuovo blu di metilene come colorante per l'RNA.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il coefficiente di correlazione, la retta di regressione lineare.

Risultati: Parametri eritrocitari SE-9000: soggetti normali Hb g/dl cv 5.29; HCT% cv 5.36; RET % cv 25; HFR%cv 65.31; MFR%cv 28.99;IMR cv 37.10.Soggetti patologici: Hb g/dl cv 13.97; HCT% cv 14.56; RET % cv 37.23; HFR% cv 53.09; MFR% cv 29.60 IMR cv 43.77. Parametri eritrocitari GENS soggetti normali: Hb g/dl cv 5.54 HCT% cv 5.29 RET % cv 38.34 IRF cv 16.66. soggetti patologici: Hb g/dl cv 13.66 HCT% cv 13.99 RET % cv 30.47 IRF cv 18.91

GENS vs SE – 9000 Soggetti normali

	r	p	retta
RET% vs RET %	0.83	< 0.05	Y = - 0.08 + 1.11X
IRF vs HFR	0.35	< 0.05	Y = 0.27 + 0.0098X
IRF vs HFR + MFR	0.32	< 0.05	Y = 0.24 + 0.0031X
IRF vs IMR	0.33	< 0.05	Y = 0.2 + 0.0023X

GENS vs SE – 9000 Soggetti patologici

	r	p	retta
RET% vs RET %	0.91	< 0.05	Y = 0.73 + 0.9127X
IRF vs HFR	0.40	< 0.05	Y = 0.31 + 0.0087X
IRF vs HFR + MFR	0.52	< 0.05	Y = 0.24 + 0.0047X
IRF vs IMR	0.53	< 0.05	Y = 0.27 + 0.0025X

Conclusioni: I nostri dati preliminari, indicano che l'IRF del GENS potrebbe essere un parametro sensibile (<CV) della attività eritropoietica midollare (indice di accelerazione). La valutazione dei parametri reticolocitari di maturazione, differentemente forniti dalle strumentazioni, evidenzia la necessità di adottare univoci criteri di utilizzo clinico in riferimento alle attuali differenti metodologie difficilmente correlabili e standardizzabili.

L'EMATURIA: UN MODELLO CHE DESCRIVE LE NUOVE TENDENZE NELL'ANALISI DELLE URINE (parte I)

Pirovano B., Fenili D.

Ospedali Riuniti di Treviso, U.O. di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviso

La definizione dell'ematuria sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo assume un ruolo importante nella diagnosi e nel monitoraggio delle patologie dell'apparato escretore. Per quanto attiene l'aspetto quantitativo la valutazione di laboratorio si basa oggi su 4 possibili approcci: 1) la chimica a secco, 2) l'esame microscopico del sedimento urinario, 3) la conta in camera su urina nativa e 4) l'analisi mediante citometria a flusso. L'assenza di un metodo di riferimento e la discordanza dei dati bibliografici ci ha spinto ad approntare uno studio atto a verificare l'affidabilità analitica delle 4 metodologie.

Per la valutazione dell'affidabilità analitica delle strisce reattive del commercio (Combur 10-Roche e N-Multisticks – Bayer) sono stati inclusi nello studio 1237 campioni di urina provenienti dalla routine. 92 campioni positivi per emoglobinuria sono stati utilizzati per lo studio di correlazione tra esame del sedimento e la conta in camera (escrezione oraria di eritrociti), mentre 243 sono stati utilizzati nella correlazione tra il citofluorimetro UF-100™ (Sysmex) e l'esame microscopico del sedimento urinario preparato secondo il protocollo NCCLS GP 16-A.

I limiti di rilevabilità delle strisce reattive, espressi come D10 e D90, sono pari a 7-9 emazie /µl (D10) e 18-24 emazie/µl (D90) rispettivamente per le strisce Combur 10 e le N-Multisticks. I valori predittivi positivi e negativi, per una prevalenza dell'ematuria del 15.2%, sono rispettivamente di 80.7% e 90.3% per le N-Multisticks e di 92.3% e 84.7% per le Combur-10. I coefficienti di correlazione ottenuti sono di 0.944 tra il conteggio in camera delle emazie e la conta per campo microscopico e di 0.902 tra quest'ultima e l'UF-100.

Gli studi di imprecisione analitica effettuati su 20 campioni ripetuti a 3 diverse concentrazioni presentano un CV% rispettivamente di 41.5, 42.4, 27.9 per l'esame del sedimento e di 12.0, 5.7 e 2.1 per l'UF-100.

I nostri risultati evidenziano una buona sensibilità delle strisce reattive, ma un'ampia dispersione dei valori se rappresentati in forma numerica. L'espressione dei risultati in classi di concentrazione appare più idonea ai fini interpretativi.

L'esame microscopico in contrasto di fase, effettuato con protocollo standardizzato, fornisce risultati che concordano con la conta in camera.

Infine esiste una buona correlazione tra l'esame microscopico del sedimento e la citofluorimetria a flusso (UF-100™), anche se i batteri, i miceti ed i nemaspermi interferiscono positivamente, e qualora presenti, richiedono una revisione microscopica dei risultati.

L'EMATURIA: UN MODELLO CHE DESCRIVE LE NUOVE TENDENZE NELL'ANALISI DELLE URINE (parte II)

Pirovano B., Fenili D.

Ospedali Riuniti di Treviglio, U.O. Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviglio

La valutazione delle alterazioni strutturali acquisite dagli eritrociti nel passaggio attraverso il tubulo renale è stato oggetto di numerosi studi, che hanno identificato nell'assorbimento della proteina di Tamm-Horsfall sulla membrana, nelle variazioni di osmolalità subite nel passaggio attraverso i diversi tratti dell'ansa di Henle e nella presenza di enzimi originati dalla lisi degli eritrociti, i fattori promuoventi le modificazioni strutturali evidenziabili in microscopia elettronica e ottica. Le principali alterazioni acquisite dagli eritrociti di origine renale introducono due elementi utili nella diagnostica differenziale dell'ematuria: la riduzione del volume globulare (MCV) ed il dismorfismo delle emazie (1). Peraltro la misura del MCV è problematica nelle urine, qualora si utilizzino i contaglobuli del commercio per i potenziali interferenti quali i nemaspermi, i batteri, i miceti ed i cristalli, mentre la valutazione delle emazie dismorfiche risente della soggettività di chi legge i preparati. Una maggiore specificità può essere ottenuta considerando nell'ambito delle emazie dismorfiche i soli acantociti (G1 eritocytes), e misurando la distribuzione del volume globulare delle emazie con uno strumento dedicato all'analisi degli elementi figurati urinari (Sysmex UF-100™). Per la carenza di dati comparativi in letteratura e per le scarse indagini, tra l'altro contraddittorie, sull'impiego della citometria a flusso nella identificazione dell'origine dell'ematuria, abbiamo confrontato i valori predittivi degli indici presi in esame (% emazie dismorfiche, % di acantociti, distribuzione del volume globulare in citometria a flusso).

A tale scopo sono stati selezionati 42 campioni di urina raccolti in pazienti con diagnosi biptica di patologia renale così classificata: membrano-proliferativa (n=7), mesangio-proliferativa (n=15), endocapillare (n=4), e nefropatia da IgA (n=16). Sono stati inclusi inoltre nello studio 73 campioni di urine provenienti da pazienti affetti da patologie urologiche ed in particolare: 38 con calcolosi urinaria, 15 con cistite e 20 con neoplasie vescicali. La valutazione del dismorfismo eritrocitario (>80%) e dell'acantocituria (>5%) identifica correttamente 36/42 pazienti affetti da nefropatia e 71/73 pazienti con patologia urologica. La valutazione delle emazie microcitiche mediante citometria a flusso, invece, classifica correttamente 31/42 portatori di nefropatia e 47/73 pazienti affetti da patologie urologiche. In base ai risultati ottenuti vengono discussi i potenziali interferenti in citofluorimetria e viene fortemente raccomandata l'introduzione nei laboratori di Biochimica Clinica di metodi idonei alla valutazione delle alterazioni qualitative eritrocitarie.

(1) Tomita et al.: Clinical Nephrology, 1992;37:84-89.

EVALUATION OF HUMAN SPERM BY FLOW CYTOMETRY

Ferrara F., Grossi D., Bonini P.A.

Servizio di Medicina di Laboratorio IRCCS H.S. Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano

Infertility is an emerging medical problem in western countries: one out of five couples is estimated to have problems for conception. Male infertility is the single most common cause of infertility, with spermatozoal defects accounting for some 30-50% of cases of sub-fertility. The assessment of semen analysis parameters, namely sperm concentration, motility morphology and viability as well as liquefaction, pH and volume remains the main laboratory investigation of the male partner of an infertile couple, in spite of a high degree of intra-subject variability. In an attempt to standardize the manual semen analysis, computer assisted sperm analysis (CASA) systems have been developed. In CASA system, a series of videotaped microscopic images are digitalized, and computer software programs are used to evaluate sperm count, motility and morphology. Current CASA systems are not suitable for evaluating semen samples for many patients. Sperm concentration reportedly was overestimated by 30% when only 11 to 60 cells per high power field were present, and spurious counts of 3.6×10^6 sperms/mL were reported in azoospermic donors. In male fertility study, the range below 20×10^6 sperms/mL is of particular interest: only lower sperm concentration seem to reduce the chance for a pregnancy, with a crucial limit in the range around 5×10^6 sperms/mL. At this range the CASA system presented the poorest performance: the value of its routine use for the determination of sperm concentration in an infertility laboratory is limited. Moreover, CASA systems are dedicated only to sperm analysis and are very expensive and not suitable for general laboratories having small batches of semen analysis. An effective solution is represented by the flow cytometric automation of sperm analysis at low costs and reduced manpower, permitting, in addition, standardization, quality control and interlaboratory comparisons, as for typical clinical laboratory assays. Flow cytometric studies of semen samples have been advanced by the need for rapid, sensitive, objective and multiparameter measurement of fertility potential of human sperm. In the past three years flow cytometric technology has reached a mature level that allows its inclusion in the list of available and routine methods for study of reproductive capacity. We use flow cytometry to perform sperm analysis: this technique, allowing rapid analysis of the biophysical and biochemical characteristics of particles, represent an ideal tool for such purposes.

Ferrara F et al. Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. Clin Chem 1997 43:5:801-807.

“SEMI-THIN SECTIONS” OF PERIPHERIC NERVE BIOPSIES: AN OBLIGATORY STEP

Lavalpe V., Amati A., Lamberti P., Serlenga L.

Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli Studi di Bari, p.zza G. Cesare Policlinico, 70124 BARI

Purpose of the study:

The use of synthetical resin for embedding of biopsies, especially from periferic nerves, is an obligatory step for a correct histopathological diagnosis. Nevertheless taking into account the complexity of this technique it is necessary to performe the biopsy in specialized laboratories. The aim of our study is to describe our methodology and to illustrate its advantages comparing with traditional procedures for histopathological diagnosis

Materials and Methods:

Peripheric nerve biopsy is made possible by a day-hospital regime of the Patient. After the local anesthesia in the tibial region with Carbocaina, a 3-5 cm of the sural nerve is immediately sent to the lab for examination. A part of the nerve, about 5 mm, is freezed in the liquid nitrogen. The remaining part is fixed in a plastic holder and the assemble is put in 2% glutaraldehyde solution for 36 hours. After the fragmentation, the resulting fragments of the nerve are put in saccharose solution for 24 hours. After that, it is performed a post-fixation in osmium tetroxide 1% for 2 hours in 4°C. After washes in phosphate buffer, dehydration in gradual concentrations of alchol is subsequently performed. After two last steps in propilene oxide, it is embedded in plastic resin, starting in liquid state, Epon 812, and then polimerized together with the bioptic fragments for 3 days. At the end of the third day we take semi-thin sections of 0.5-1 micron trough the ultramicrotome generally using a glass strips. These sections are coloured with blue toluidine in 80 °C and, after that, immersed in xilol and mounted in immersion oil and observed in M.O.

Results and Conclusions:

The method, which is typical for electronic microscopy, modified in this way, gives the possibility to visualize before coloration, the sections with a normal optical microscopy. The observation of the semi-thin sections results optimal, especially to higher magnifications. Regarding the resolution, the thinnes of sections comparing to those taken with paraffin, gives the possibility for a more precise histo-pathology diagnosis.

References:

- Slepecky NB et al. Study of afferent nerve terminals and fibers in the gerbil cochlea: distribution by size. *Hear Res.* 2000 Jun; 144(1-2): 124-34.

- Hayat MA. Principles and Tecnique of electron microscopy. 3rd edition. Boca Raton: CRC Press, 1989, 79-137.

BASI MOLECOLARI DELLE AMILOIDOSI EREDITARIE IN ITALIA

Obici L.*, Palladini G.[§], Bruno M.*, Marciano S.*, Perfetti V.[§], Moratti R.^{#^}, Merlini G.*[^]

Laboratori di Biotecnologie e Tecnologie Biomediche*, Medicina Interna ed Oncologia Medica[§], Servizio Analisi Chimico-Cliniche[#], IRCCS Policlinico San Matteo, Viale Golgi 19, 27100 Pavia e Dipartimento di Biochimica[^], Università di Pavia, Via Taramelli 3/b, 27100 Pavia.

Le amiloidosi sistemiche ereditarie sono un gruppo di malattie a trasmissione autosomica dominante causate da mutazioni puntiformi nei geni che codificano per alcune proteine quali la transtiretina, l'apolipoproteina A1, il lisozima, la catena α del fibrinogeno e la gelsolina. Singole sostituzioni aminoacidiche conferiscono alle proteine la proprietà di aggregarsi in forma di fibrille di amiloide che si depositano a livello extracellulare in diversi organi e tessuti. L'esordio clinico avviene in età adulta e il quadro è variabilmente dominato dalla insorgenza di cardiomiopatia, polineuropatia, nefropatia ed epatopatia.

Abbiamo ricercato la presenza di mutazioni nei geni transtiretina (TTR), apolipoproteina A1 (apoA1), fibrinogeno e lisozima in 40 pazienti riferiti presso il nostro Centro con diagnosi di amiloidosi non tipizzata, di cui 19 con anamnesi familiare positiva per la malattia e 21 con una biopsia positiva per amiloide senza i criteri diagnostici della forma AL.

Lo screening di mutazioni è stato effettuato mediante sequenziamento automatico di frammenti di PCR amplificati da DNA genomico. La presenza di ogni mutazione è stata confermata mediante analisi di polimorfismi di restrizione, introducendo artificialmente il sito di taglio (AIRS) quando la mutazione non crea e non abolisce un sito di restrizione naturale.

Abbiamo identificato la presenza di una mutazione allo stato eterozigote in 30/40 casi studiati: in 15 pazienti è presente una variante di TTR, in 13 pazienti la mutazione interessa il gene apoA1 e 2 pazienti sono portatori della medesima variante Glu526Val della catena α del fibrinogeno. Le 2 varianti identificate nel gene apoA1, Leu75Pro e Leu174Ser, sono esclusive della popolazione italiana: la prima è stata identificata in 11 pazienti di origine lombarda affetti da amiloidosi epatica mentre la seconda si associa ad interessamento cardiaco ed è stata finora individuata in due famiglie di origine umbra. In entrambi i casi la tipizzazione immunostochimica ultrastrutturale dei depositi di amiloide ha confermato la presenza di fibrille di apoA1. L'amiloidosi da TTR presenta una notevole eterogeneità genetica nella nostra popolazione con nove mutazioni identificate, di cui la Val30Met è la più frequente.

Complessivamente lo studio molecolare ha confermato la diagnosi di amiloidosi ereditaria in 15 pazienti con familiarità per la malattia e ha permesso di chiarire la natura dei depositi in altrettanti casi senza evidente familiarità.

3r, UN GENE DELLA FAMIGLIA V λ III, È STRETTAMENTE ASSOCIATO ALL'AMILOIDOSI PRIMITIVA (AL)

Perfetti V., Casarini S., Colli Vignarelli M., Rotundo S., Palladini G., Merlini G.

IRCCS Policlinico S. Matteo, Med. Int. ed Oncol. Med., Dipartimento di Biochimica, Laboratorio di Biotecnologie, Pavia.

Obiettivo: La amiloidosi primaria è una malattia ad esito infausto caratterizzata dalla deposizione di catene leggere sotto forma di fibrille di amiloide nello spazio extracellulare di vari organi. La deposizione è sistemica e progressiva, ma un singolo organo, o una combinazione di alcuni organi, domina di solito il quadro clinico e condiziona prognosi e trattamento. I meccanismi che regolano la "amiloidogenicità" e il tropismo d'organo non sono noti. E' possibile che l'analisi dell'uso dei geni delle regioni variabili delle catene leggere λ ($V\lambda$) possa fornire indicazioni rilevanti alla comprensione di questi aspetti. A questo scopo, abbiamo analizzato l'uso di questi geni in una popolazione generale di pazienti con amiloidosi.

Metodo: 49 pazienti consecutivi arruolati presso il centro coordinatore di un protocollo nazionale per l'amiloidosi. L'organo principalmente coinvolto era: rene (#18, 37%), cuore (#16, 33%), fegato (#4, 8%), sistema nervoso periferico e muscolo (#3 ciascuno, 6%), gastroenterico (#2, 4%), polmone, cute, tessuti molli (#1 ciascuno, 2%). L'isolamento delle $V\lambda$ monoclonali è stato eseguito tramite PCR inversa (Perfetti et al, Anal Biochem 239:107, 1996).

Risultati: Una $V\lambda$ monoclonale è stata isolata in tutti i casi (efficienza 100%). Tutte le $V\lambda$ presentavano mutazioni somatiche. Abbiamo osservato il seguente utilizzo delle famiglie $V\lambda$: λ III (#24, 49%), λ VI (#11, 22%), λ II (#8, 16%), λ I (#5, 10%), e λ IV (#1, 2%). Tredici (43%) dei 30 possibili geni germline erano utilizzati: 3r e 6a (#11 ciascuno, 22%), 3h (#5, 10%), 2a2, 3l (#4 ciascuno, 8%), 1b, 3m (#3 ciascuno, 6%), 2b2, 2e (#2 ciascuno, 5%), 1c, 1e, 3j, 4b (#1 ciascuno, 2%). Il gene 3r era associato a vari organi bersaglio. In contrasto, il gene 6a (già noto come amiloidogenico) appariva più frequentemente riarrangiato nei pazienti con esclusivo o predominante interessamento renale (8/11 casi).

Conclusioni: a) la famiglia $V\lambda$ più frequentemente utilizzata nella amiloidosi è la λ III ($P < 0.001$); b) due geni, 3r e 6a, codificano per circa 40-45% delle catene leggere amiloidogeniche; c) il gene 6a è apparentemente associato ad interessamento renale. Dal momento che il gene 3r è riarrangiato ad una frequenza di circa 7-8% nel normale repertorio (Farner et al, J Immunol 162:213, 1999), questo stesso gene deve possedere significative proprietà amiloidogeniche.

QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR MEASUREMENT OF b-FGF GENE EXPRESSION IN BREAST CANCER

Pinzani P., Tricarico C., Orlando C., Distante V.* , Pazzagli M.

Clinical Biochemistry Unit, Dept. of Clinical Physiopathology and *Surgery Unit, University of Florence, Italy

The basic fibroblast growth factor (b-FGF) is a potent mitogen and angiogenic in vitro. It is considered one of the principal growth factors with angiogenic potential as well as the vascular endothelial growth factors (VEGF) and the transforming growth factor- β (TGF- β).

This study examines the expression of bFGF in the malignant human breast by a real-time quantitative method based on the detection of a fluorogenic probe.

We have developed a system for the quantification of b-FGF mRNA expression by the ABI PRISM 7700 Sequence Detector System which is based on TaqMan technology and Laser Induced Fluorescence. The specially designed fluorogenic Taqman DNA Probes are characterized by two labels: 5' fluorescent label (FAM) and a 3' quencher molecule (TAMRA). Because of the close proximity of label and quencher, most of the fluorescent signal is quenched. After hybridization to a DNA molecule during the PCR, the TaqMan probe is degraded due to the nuclease properties of the Taq polymerase. After degradation, the fluorescent label is separated from the quencher and an increase of signal can be measured by a CCD camera. This procedure opens the possibility for real-time monitoring of DNA amplification. Semi-automated quantitation of starting copies of DNA or cDNA can thus be achieved.

By this method we performed quantitation of b-FGF in 75 breast carcinoma samples as well as on the corresponding non adjacent non neoplastic tissue of the same patients. The proposed method has a dynamic range from 10^9 to 10^5 b-FGF mRNA copies number. The intra-assay precision of the test, evaluated as signal detection variability, was 2.4%. The accuracy of the system was established by comparison with a competitive RT-PCR method. The proposed method is less labor-intensive than the competitive RT-PCR assay.

In our clinical study, bFGF was detectable in both neoplastic samples and in the corresponding non adjacent non neoplastic tissues. Higher levels bFGF mRNA were observed in non-malignant breast tissues ($\text{mean} \pm \text{S.E. } 1.53 \times 10^{10} \pm 1.46 \times 10^{10}$) than in breast cancer tissues ($4.70 \times 10^9 \pm 3.7 \times 10^9$). No correlation was found between bFGF mRNA expression and T stage, nodal status or oestrogen and progesterone receptor status. Linear regression analysis between bFGF mRNA levels and VEGF gene expression as evaluated by a real-time RT-PCR method showed a good correlation in both neoplastic ($r=0.57; n=59, p < 0.001$) and non-neoplastic tissues ($r=0.66; n=57, p < 0.001$). Although, according to previous findings, our data suggest that bFGF is not a major angiogenic factor in human breast cancer, it should be kept in mind that bFGF and VEGF have synergistic effect on angiogenesis.

C. Yianguo et al. *Br J Cancer* (1997) 75:28-33

MISURA DELL'ATTIVITÀ DELLA TELOMERASI E DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL'mRNA DI hTERT NEI CARCINOMI DEL COLON

Poggesi M., Gelmini S., Casini Raggi C., Pazzagli M., Orlando C.

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Firenze

La telomerasi provvede a stabilizzare e proteggere i cromosomi dalla perdita di sequenze telomeriche che si verifica per l'accorciamento progressivo a cui vanno incontro le estremità cromosomiche ad ogni ciclo di replicazione cellulare. Il raggiungimento di una lunghezza telomerica critica, incompatibile con la sopravvivenza cellulare, induce il blocco della replicazione che può essere superato mediante l'attivazione di meccanismi che permettono la stabilizzazione cromosomica. La telomerasi, catalizzando l'addizione di ripetizioni esanucleotidiche all'estremità 3' del DNA cromosomico, previene la perdita di sequenze telomeriche contribuendo a mantenere l'immortalità cellulare e la crescita incontrollata delle cellule, che sono alla base della trasformazione neoplastica e del mantenimento del fenotipo tumorale. Per la frequenza con cui risulta attivata nei tumori, l'attività telomerasica (TA) sembra essere un marker promettente nella diagnosi e nella terapia dei tumori umani. Nel nostro studio abbiamo quantificato l'attività di questa ribonucleoproteina in 52 tumori del colon e nei rispettivi campioni di mucosa sana con metodica TRAP (telomeric repeat amplification protocol) modificata mediante l'impiego di un fluorocromo specifico per il DNA a doppia elica, il PicoGreen (S. Gelmini et al., 1998). I valori della TA nei carcinomi (media \pm SD: 122,9 \pm 97,9 ng DNA/ μ g proteine) risultano significativamente più elevati ($p=0.00081$) rispetto ai corrispondenti campioni di mucosa sana (81,2 \pm 68,3). La TA risulta inoltre positivamente correlata fra i due gruppi di campioni ($r=0.44$, $p<0.001$). Per meglio chiarire il ruolo della telomerasi nei carcinomi del colon, abbiamo valutato anche l'espressione dell'mRNA della subunità catalitica della telomerasi (hTERT) con "Real-Time" PCR mediante sistema TaqManTM. Inoltre anche in questo caso, la media dei valori relativi alla misura del messaggero di hTERT nei carcinomi (media \pm SD: 2962,4 \pm 7644,0 fg RNA HT1080/ μ g RNA totale) risulta significativamente più elevata ($p=0.022$) rispetto a quella relativa ai campioni di mucosa sana (1434,0 \pm 3588,0). L'mRNA di hTERT risulta correlato nei campioni tumorali con i normali ($r=0.75$, $p<0.001$). Da questi dati emerge che sia la misura della TA che di hTERT rivelano la presenza di telomerasi anche nei tessuti apparentemente sani e che esiste una notevole correlazione di questi due valori con quelli ottenuti nei corrispondenti tessuti tumorali. Questo risultato sembra indicare che l'attivazione della telomerasi sia un evento precoce nella carcinogenesi colon-rettale.

STUDIO DI RIVELAZIONE DEL VIRUS DELL'EPATITE G-RNA (HGV) CON TECNICA PCR IN PAZIENTI HCV-RNA POSITIVI

Paduano G., Forino E., Cianciulli M.R., Tomeo L., *Varriale V., Masi V.

Azienda Ospedaliera "S.G. Moscati", Avellino.

*Dipartimento Medicina di Laboratorio Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Il virus dell'epatite G (HGV), anche conosciuto come GB virus-G (HGBV-C), è stato identificato recentemente come un nuovo membro della famiglia delle Flaviviridae. Il virus contiene un genoma ad RNA a singola elica di circa 9500 bp, a polarità positiva, in grado di codificare una poliproteina che viene successivamente processata nelle diverse proteine strutturali e di funzione del virus. Il genoma dell'HGV presenta alle estremità 5' una sequenza conservata 5' (5' UTR) e analogamente alla estremità 3' (3' UTR). La comparazione delle sequenze amminoacidiche di HGV e HCV mostra un 26-29% di omologia.

Per rivelare il virus dell'HGV-RNA abbiamo utilizzato una tecnica che prevede l'uso della PCR. Le fasi metodologiche sono: estrazione dell'RNA virale da siero, retrotrascrizione con un primer specifico della regione 5' UTR, amplificazione del prodotto retrotrascritto e rivelazione dell'amplificato su gel di agarosio Nusive al 4%. I pazienti positivi all'HGV-RNA mostrano un prodotto di amplificazione di 185 bp.

Sono stati esaminati 96 pazienti ospedalizzati in diverse fasi di infezioni: attive e in remissione con HCV-RNA positivi e anticorpi positivi. Dei 96 pazienti HCV-RNA positivi, n. 19 (20%) presentavano l'HGV-RNA nel siero. Tali pazienti risultavano resistenti alla terapia farmacologica e non presentavano, quindi, remissione della malattia.

HYBRID CAPTURE BASED HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPING IN CERVICAL SPECIMENS COMPARED TO CYTOLOGY (PAP SMEAR) AND COLPOSCOPIC BIOPSY

Petasecca Donati P.*, Gaido J.*, Leszczynski W.°, Votano S.‡, Fusco A.**

*Lab. Analisi, Servizio di Dermatologia Ambulatoriale dell'Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS Roma, ‡Ginecologia, Ospedale San Carlo di Nancy Roma, **Direttore del Laboratorio Analisi Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS Roma.

Background: Human papillomavirus (HPV) infections are related to several cutaneous and mucosal dysplasias, including both benign and malignant lesions. Recent developments in HPV DNA detection techniques have shown that HPV infections in the female genital tract are common but the progression of the disease may require several factors such as the persistence of the infection, the viral load, co-infection with multiple genotypes, the presence of immunodeficiencies and possibly the presence of other cofactors. **Objective:** The utility of a molecular assay for detection of HPV in cervical smears was evaluated. **Study design:** A total of 57 women aged between 22 and 69 years (36 median) with normal cytology, with low-grade lesion (L-SIL) and high-grade lesion (H-SIL) in cervical cytology, were studied. In all women with L-SIL and H-SIL, a colposcopically directed biopsies were performed. Hybrid capture (HC II) testing for 14 human papillomavirus types (Digene Hybrid Capture II) were tested on all 57 women. **Results:** Based on cytology results, 22 patients showed normal cytology, 31 low-grade squamous intraepithelial lesions (L-SIL) and 4 high-grade squamous intraepithelial lesions (H-SIL). With the molecular assay, HPV was detected in 29/57 (50.8%) patients. The high-risk HPV types was present in 20/29 (68%) patients and the low-risk type in 7/29 (24%) patients; in two women was present high and low-risk HPV types. The sensitivity of hybrid capture for colposcopic biopsy was 84% (16/19) and a specificity 50% (8/16); the corresponding values for Papanicolaou smear were 68% (25/35) and a specificity 77% (17/22). All the colposcopic biopsies (4) evocative of invasive carcinoma, were positive for high-risk HPV presenting a PAP smears of H-SIL lesions. **Conclusion:** HPV detection with the HC II assay represents an easy test for routine use, in molecular biology laboratory. In our, small experience, its sensitivity for the detection of HPV DNA is higher than classic cytological smears, 84% versus 68%, when compared with "gold standard" of biopsies. This sensitivity makes this assay highly recommendable for routine detection of high-grade lesion, in association with cytological examination.

References: 1) Poljak M. et al. Comparative evaluation of first and second-generation Digene Hybrid Capture Assays for detection of human papillomavirus associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin M* 1999, 37,796-797

ANALISI GENETICA DI PAZIENTI CON ASSENZA CONGENITA DEI VASI DEFERENTI

¹Grandoni F., ¹Quattrucci S., ²Seia M., ¹Ferraro A., ¹Narzi L., ^{1,3}Lucarelli M., ²Cantù Rajnoldi A., ¹Antonelli M., ³Strom R.

¹Centro Fibrosi Cistica Regione Lazio, Clinica Pediatrica, Università di Roma "La Sapienza"; ²Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano; ³Servizio Biochimica Clinica, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università di Roma "La Sapienza"

OBIETTIVI. Su un gruppo di pazienti con Assenza Congenita Bilaterale dei Vasi Deferenti (CBAVD), è stato studiato il genotipo relativo al gene CFTR le cui mutazioni causano la Fibrosi Cistica (FC). Gli scopi del lavoro erano: 1) valutare la frequenza delle mutazioni più comuni del gene CFTR; 2) valutare la frequenza e l'associazione dei due tratti polivarianti: poli-T e poli-TG, localizzati nella zona di giunzione introne 8 / esone 9; 3) valutare il coinvolgimento degli alleli varianti T5 e TG12, comunemente coinvolti nelle forme atipiche di FC, nella definizione dei soggetti con CBAVD.

METODOLOGIA. 25 pazienti affetti da CBAVD, in seguito alla valutazione clinica, sono stati sottoposti a test del sudore, studio della funzionalità respiratoria e indagine genetica. Quest'ultima, per ciò che concerne le comuni mutazioni del gene CFTR, è stata realizzata con il metodo PCR/OLA/SCS (PE Applied Biosystems) e mediante DGGE, mentre i tratti poli-T e poli-TG sono stati esaminati mediante sequenziamento diretto (il tratto TG finora è stato indagato solo in 17 soggetti).

RISULTATI. In 14 pazienti su 25 (56%) è stata trovata almeno una mutazione comune del gene CFTR. L'allele T5 è stato trovato in 14 alleli su 50 (28%) mentre l'allele TG12 è stato trovato in 11 alleli su 34 (33%). L'aplotipo TG12-T5 è stato trovato in 9 alleli su 34 (26%). Tra i 17 soggetti caratterizzati per le sequenze poli-T e poli-TG, 13 (76%) presentavano almeno un allele variante (T5 e/o TG12) mentre 9 (53%) mostravano l'aplotipo TG12-T5. Tutti i pazienti (tranne uno) con una mutazione comune del gene CFTR, mostravano l'aplotipo TG12-T5. La valutazione clinica ha dimostrato che alcuni soggetti esaminati, oltre al difetto primario di CBAVD, mostravano sintomi correlabili a forme attenuate di FC.

CONCLUSIONI. La CBAVD è considerata una forma monosintomatica di FC con un'elevata frequenza di mutazioni del gene CFTR. L'analisi del poli-T e poli-TG risulta utile nella caratterizzazione genetica dei soggetti CBAVD. L'alta frequenza dell'aplotipo TG12-T5 nei soggetti esaminati, oltre a confermare precedenti risultati circa il ruolo dell'allele T5 nelle forme lievi di FC, dimostra anche l'importanza dell'allele TG12 nel potenziare l'effetto del T5. Infine la presenza di altre manifestazioni cliniche tipiche delle forme lievi di FC, evidenzia che questa manifestazione può essere considerata piuttosto una forma oligosintomatica di FC. Per tale motivo si ritiene utile una periodica e approfondita valutazione clinica di tali soggetti. Zielenski J., Patrizio P., Corey M., Handelin B., Markiewicz D., Asch R., Tsui L. C. 1995. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 958-960.

CORRELATION BETWEEN IL-1 β MRNA LEVELS AND IL-1 α AND IL-1 β POLYMORPHISM

Dassi C., Signorini S., Brambilla P.*, Radice C., Molteni P., Mocarelli P.

University Department of Laboratory Medicine - Hospital of Desio, Via Mazzini 1, 20033 Desio (MI).

*Department of Laboratory Medicine - Hospital of Merate, L.go L. Mandic 1, 22055 Merate (LC).

IL-1 is one of the major mediators of the natural immune response and inflammation. Increases in the plasma levels of this cytokine have been detected in various infectious and inflammatory diseases. For this reason it could be of interest quantifying its expression.

The genes of the IL-1 complex are polymorphic and the various alleles may differ in their capability to produce the cytokine. Increased plasma levels of IL-1 β were detected in IL-1 α 2-2 homozygotes compared to the IL-1 α 1-1 (1). In our work IL-1 β mRNA expression has been studied in 118 healthy subjects, smokers and non-smokers, and the expression levels were correlated with IL-1 β polymorphism (base exchange at the position -511 in the promoter region) and IL-1 α polymorphism (base exchange at the position -889).

Quantitation of IL-1 β mRNA was performed by calibrated-competitive RT-PCR on RNA extracted from blood mononuclear cells. The two polymorphisms in IL-1 β and IL-1 α genes were detected with RFLP-PCR method (1) on DNA extracted from whole blood.

No differences were observed in mRNA expression neither for gender nor for smoke habit. No correlation was found between the two polymorphisms studied and the level of expression of IL-1 β . This could be due to the low number (n=8) of IL-1 α 2-2 homozygotes in our population or perhaps a post-transcriptional regulation mechanism could be responsible of the influence of a particular allelic polymorphism on the plasma level of IL-1 β .

Reference:

1. Hulkkonen J., Laippala P., Hurme M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 β plasma levels in healthy individuals. *Eur. Cytokine Netw.* 2000; 11: 251-5.

DETERMINAZIONE DI CMV-DNA IN MATERIALI BIOLOGICI DI DIVERSA ORIGINE MEDIANTE IL SISTEMA "DIGENE HYBRID CAPTURE"

Bailo M., Signorini S., Mantero G., Briscini L., Lattuada L., Marin M.G.

Centro Analisi Fleming, Via Cipani 18/A, 25100 Brescia

Scopo: poter impiegare il sistema "Digene Hybrid Capture CMV DNA" per la determinazione del DNA del CMV in materiali diversi dal sangue intero (urine, liquor).

Metodo: il campione di urine è stato concentrato e risospeso in tampone di lisi; dopo incubazione è stato centrifugato e il pellet ottenuto risospeso in apposito diluente. Il campione di liquor è stato ultracentrifugato, risospeso in tampone di lisi e sottoposto ad ulteriore ultracentrifugazione per ottenere il pellet da utilizzare per il test. Per l'analisi quantitativa del CMV DNA è stata seguita la procedura indicata dal kit Digene Hybrid Capture DNA System (versione 2.0) (distribuito da Abbott Divisione Diagnostici, Roma). Per entrambi i tipi di campioni è stata effettuata anche un'analisi qualitativa con il seguente metodo: estrazione del DNA, amplificazione mediante PCR con primers specifici per la regione della polimerasi dei virus erpetici (Bioline Diagnostici, Torino), rivelazione tramite gel-elettroforesi e ibridazione con sonda specifica su micropiastra.

Risultati: le metodiche seguite hanno permesso, per entrambi i tipi di campioni, di effettuare la determinazione quantitativa di CMV-DNA e in ogni caso la positività del campione è stata confermata dal test qualitativo eseguito. In conclusione si può affermare che appropriate modifiche, nella fase di preparazione, permettono di ampliare la tipologia dei materiali biologici sui quali è possibile effettuare la determinazione quantitativa di CMV-DNA mediante il sistema "Digene Hybrid Capture".

Riferimento bibliografico:

J Clin Microbiol, 1999, 37: 2804-2807

A NOVEL CARDIAC TROPONIN T MUTATION IS ASSOCIATED WITH FAMILIAL HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY CHARACTERISED BY HETEROGENOUS CLINICAL EXPRESSION

Frusconi S., Girolami F., Passerini I., Torricelli F., Olivotto I.*, Cecchi F.*

U.O. Citogenetica e Genetica e (*) U.O. Cardiologia 2 S.Luca, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze

Mutations of the gene coding for cardiac troponin T (TNNT2) are responsible for 6-15% cases of familial hypertrophic cardiomyopathy (HCM), and have been associated with mild degrees of LV hypertrophy but relatively high risk of sudden death. We describe a novel TNNT2 missense mutation associated with familial HCM characterized by a very heterogeneous morphologic and clinical expression. Methods: we performed a mutation study of TNNT2 in over 100 unselected patients with HCM, by Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) and Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) followed by automatic sequencing (ABI Prism 377 e ABI Prism 310). Results. The new mutation was found in heterozygosis in the proband (a 29-year old woman) and her mother, located in codon 120 of exon 10 (TTT→TTG), and causes the substitution of a phenylalanine with a leucine (Phe120Leu) in the protein. The presence of a polymorphism was excluded by the study of 100 healthy controls, none of which had the mutation. The proband is affected by non-obstructive HCM characterised by severe hypertrophy (maximal septal thickness 33 mm), diagnosed in infancy due to recurring chest pain, syncope and ventricular arrhythmias (for which she eventually required an implantable defibrillator). Her mother and grandfather were also found to be affected, although their phenotype was characterised by mild hypertrophy (19-22 mm), and they experienced no adverse events or symptoms. Since another mutation has been described in the same codon (Phe120Ile; Cardiology 2000, 93:155-162), our finding supports the hypothesis of a potential mutational TNNT2 *hot spot* in that position. Conclusions: a novel mutation of TNNT2 (Phe120Leu) is associated with very heterogeneous manifestations of HCM within the same family, including the development of massive LV hypertrophy. The reasons for such clinical and morphologic heterogeneity remain unknown, and may include the presence of associated mutations.

RUOLO DI TRE PARAMETRI GENETICI NEL DETERMINARE IL RISCHIO DI MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Bani P., Tassoni F., Mattana C., *Assanelli D., *Salvadori G., Albertini A. e Archetti S.

3° Lab. Anal. Chim. Clin. A.O. Spedali Civili Brescia
* Cardiologia Preventiva Univ. di Brescia

Vi sono numerosi fattori in grado di incrementare il rischio cardiovascolare; è ormai risaputo che fattori acquisiti, come fumo, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa siano strettamente correlati con il rischio, anche se si conosce ancora ben poco circa il ruolo dei fattori genetici. Quest'ultimo aspetto viene preso in considerazione nel nostro studio, dove una popolazione di giovani al di sotto dei 40 anni con infarto miocardico acuto viene confrontata con una popolazione altrettanto giovane apparentemente sana. I fattori presi in considerazione sono un polimorfismo del fibrinogeno, uno del fattore VII e il genotipo dell'Apolipoproteina E. Lo scopo dello studio è quello di mettere in risalto come la presenza di più fattori genetici concomitanti possono essere correlati con l'aumento del rischio di avere l'evento cardiovascolare; non a caso è stata presa in considerazione una popolazione appartenente ad una fascia di età, tra i 20 e i 40 anni, dove la genetica gioca un ruolo sicuramente importante. La popolazione studiata è stata selezionata dalla Cardiologia Preventiva: 98 casi e 150 controlli. Il DNA è stato estratto da sangue periferico; mediante PCR sono state amplificate le sequenze target e in seguito digerite con enzimi di restrizione specifici. I risultati ottenuti sono stati evidenziati su gel di agarosio con bromuro di etidio (Fibrinogeno) e su gel di poliaccrilamide (FVII e ApoE).

Per quanto riguarda il polimorfismo -455G/A del fibrinogeno, abbiamo ottenuto la seguente distribuzione allelica: G nel 81.6% dei casi e nel 72.1% dei controlli, mentre A nel 18.4% e nel 27.9% rispettivamente. L'Apo E era invece distribuita in questo modo: E3 nell'80% dei casi e 87% dei controlli, E4 nel 18.6% dei casi e nel 6.6% dei controlli, E2 nell'1.4% e 6.4% rispettivamente.

I risultati dello studio sono significativi se i tre fattori genetici vengono considerati in associazione: il wild type del fibrinogeno, associato al wild type del fattore VII ed all'allele E4 dell'apo E sono presenti nel 14.5% dei casi e nel 5.8% dei controlli. Al contrario, la contemporanea presenza della mutazione del fibrinogeno, F VII e presenza di Apo E3 o Apo E2 è stata rilevata nel 3.9% dei casi e 15.3% dei controlli.

Dai risultati riportati nel nostro lavoro appare evidente la differente distribuzione, nei casi e nei controlli, dell'associazione wild type fibrinogeno, F VII e Apo E4, ed è pertanto lecito supporre un ruolo favorente il rischio cardiovascolare. La contemporanea presenza della mutazione del fibrinogeno, F VII e Apo E3 o Apo E2 sembra invece avere un ruolo protettivo.

1) David A. Lane and Peter J. Grant. Blood 2000 vol.95 n.5;1517-32

RILEVANZA DEL DOSAGGIO DEL FATTORE VIIIc NELLO SCREENING DELLE TROMBOFILIE VENOSE

Simoni L., Ottomano A.M., Campioli D., Marietta M.*

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche

*Divisione Ematologia

Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena
via del Pozzo, 71 41100 Modena (Italia)

Obiettivi:

Il nostro laboratorio con l'obiettivo di rispondere a esigenze di appropriatezza diagnostica nello studio delle più frequenti patologie della coagulazione, ha introdotto alcuni profili prestabiliti in collaborazione con i clinici interessati. Tra questi abbiamo individuato uno screening per trombofilia venosa che comprendeva in un primo momento: ricerca LAC, ACA, AT, Proteina C, Proteina S. APC-R. Dal novembre 2000 abbiamo rivisto tale profilo introducendo anche il dosaggio del Fattore VIIIc.

Materiali e metodi:

Abbiamo eseguito il dosaggio del Fattore VIIIc sul coagulometro BCT (Dade Behring) mediante test di coagulazione ad un punto con plasma carente di F.VIII (reattivo della stessa ditta), utilizzando per i valori superiori a 180 % una curva di calibrazione dedicata. In tre mesi abbiamo esaminato 41 pazienti di cui 24 al primo episodio trombotico, 3 con recidive, 14 con sospetto clinico/anamnestico di trombofilia.

Risultati:

Abbiamo ottenuto una rilevante percentuale di risultati elevati (> 150%); in particolare erano positivi 15 dei 24 casi al primo episodio (62%), tutti i 3 casi con episodi recidivanti (2 dei quali con i valori più alti in assoluto della nostra casistica) mentre nei casi con sospetta trombofilia i positivi erano 5 (36%). Si segnala inoltre che in 36 dei pazienti esaminati l'alto livello di F.VIIIc era l'unico test di laboratorio alterato.

Conclusioni:

Riteniamo assolutamente opportuno inserire il dosaggio del Fattore VIIIc nello screening della trombofilia venosa in quanto, come risulta da numerose pubblicazioni scientifiche, il suo aumentato livello plasmatico si riscontra con elevata prevalenza nei pazienti con un primo episodio di trombosi e aumenta considerevolmente il rischio di recidiva con importanti ripercussioni sul trattamento terapeutico.

Bibliografia:

Rosendaal F.R. High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2000;83:1-2.

STUDY OF FACTOR V^{LEIDEN} AND PROTHROMBIN GENE POLYMORPHISM BY MEANS OF ALLELIC DISCRIMINATION

^{1,2}Bernardini S., ²Soldati M., ¹Ballerini S., ¹Bellincampi L., ³Motti C., ²Pancotti S., ²Saura F., ²Capponi C., ¹Cortese C., ^{1,2}Federici G.

¹Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Rome, ²Clinical Biochemistry, Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome, ³Inst. of Bioch. and Molecular Biology, Univ. of Teramo, Italy.

The APC-resistance is a rather common phenotype (approximately 5%) that is a risk factor for venous thrombosis. It is defined as a poor anticoagulant response of plasma to activated protein C. This phenotype can be identified by coagulation assays that measure the anticoagulant response to APC such as the APTT. Over 95% of cases with the APC-resistance phenotype are associated with heterozygosity or homozygosity for a single point at nucleotide 1691 (G1691A) in the factor V gene (Factor V^{LEIDEN}). This mutation causes that activated factor V^{LEIDEN} is more slowly inactivated by APC than normal factor V leading to APC-resistance. The prothrombin G20210A mutation might increase the risk for venous thrombosis if present in combination with the factor V^{LEIDEN} (1). The APTT-based APC resistance test is sensitive to the choice of the reagents, instrument, preanalytical conditions and other variables like serum levels of factors VIII and II and the presence of lupus anticoagulants. DNA assays based on RFLP analysis of PCR products containing the Leiden mutation permit the unambiguous detection of carriers of the mutation. Recently a new method based on allelic discrimination by rapid-cycle PCR and fluorescence resonance energy transfer (FRET) with Light Cycler (Roche) has been introduced. We study the concordance between the APC-resistance phenotype and the genotype for factor V^{LEIDEN} and prothrombin in 67 children attending the Bambino-Gesù Children's Hospital in Rome for diseases at risk of venous thrombosis. We found a frequency of factor V G1691A of 6% (8 heterozygotes), and of 5% for prothrombin G20210A alleles (1 homozygote and 5 heterozygotes). The APC resistance test (APC-R kit Roche) was positive in 10 cases but was confirmed by genotype only in 6 cases. In two subjects heterozygotes for V G1691A, the APC-R was negative. The APC-R test was able to detect the presence of the G20210A prothrombin mutation except in the case of double heterozygosity with VG1691A. In conclusion the Light Cycler allelic discrimination method for Factor V^{LEIDEN} and prothrombin genotyping seems to be rapid, simple and more accurate than phenotyping suggesting a possible routine use of this method for diagnostic purposes.

1) Lane D.A. Grant P.J. *Blood*, 95(5);2000:1517-1532.

This study was supported partly by a grant from MURST cofin. and Ministero della Sanità-Italy