

## PLASMA D-DIMER LEVELS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE

Melzi G.V.<sup>1</sup>, Merlini P.<sup>2</sup>, Finazzi S.<sup>1</sup>, Biotti M.G.<sup>1</sup>, Leoni V.<sup>1</sup>, Ageno W.<sup>1</sup>, Venco A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Insubria, Varese, Italy.

<sup>2</sup>University of Pavia, Pavia, Italy.

Patients with chronic heart failure (HF) are considered at risk for acute ischemic stroke because of a hypercoagulable state mainly caused by blood stasis in the cardiac chambers. Nevertheless, in the absence of concomitant risk factors such as atrial fibrillation (AF), the rate of thromboembolic events in these patients is rather low, and oral anticoagulant treatment (OAT) for stroke prevention is commonly not recommended. D-dimer (DD), a product of fibrin degradation, is a marker of thrombogenesis and was found to be elevated in patients with AF, whose risk for stroke is well defined. We measured DD levels in a population of outpatients with chronic HF and in 53 age matched healthy controls using a quantitative assay based on agglutination of latex microparticles (Liatest D-DI, Roche Diagnostics) with the analyzer STA-compact (Roche Diagnostics), to test potential differences in the prothrombotic state according to the ejection fraction (EF), the end diastolic left ventricular diameter (LVDd), the left atrial diameter (LAD), and to the pathogenesis of the HF. The analytical range of DD test is 0-20 µg/mL; the intra and inter-assay imprecision ranges were <5 % and <6 %, respectively; the detection limit, defined as Abs ± 2SD of the saline solution (n=20), was 0.22 µg/mL and the reference range was <0.60 µg/mL. Patients with AF, sepsis, malignancy, recent (<1 month) trauma, surgery, venous thromboembolism, myocardial infarction or stroke, or ongoing OAT were excluded. We evaluated 57 consecutive patients: 24 were enrolled and 33 had at least 1 exclusion criterion. The 2 groups of included and excluded patients were well matched according to age (69.3 and 70.1 years), clinical conditions (NYHA II: 71% and 73%) and mean EF (34.5% and 36.9% respectively). Mean DD levels in the HF group were not significantly higher than in the control group (0.77 and 0.58 µg/mL). There was no correlation between DD and EF, LVDd, or LAD measures. According to the pathogenesis, patients with ischemic HF had not significantly higher DD levels (0.86 µg/mL) than hypertensive HF (0.64 µg/mL). Mean DD for idiopathic HF was 0.78 µg/mL. DD levels in outpatients with chronic HF resulted slightly above the normal range thus showing a mild prothrombotic state. This was not related to the severity of blood stasis as evaluated with the of a low risk for thromboembolic complications and do not support a rationale for OAT in the absence of concomitant risk factors. A long term follow up is currently ongoing to assess the clinical utility of DD to predict clinical events.

## PROTOCOLLO PER LO STUDIO DELLE TROMBOFILIE: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DIAGNOSTICA

Vagni A., Mainardi E., Cancellieri E., Montanelli A.

Dipartimento di Patologia clinica – Ospedale Maggiore di Crema (CR)

**INTRODUZIONE** Nell'aprile 99 il Laboratorio, in collaborazione con alcuni reparti clinici, ha predisposto un protocollo diagnostico per le malattie tromboemboliche che prevede i seguenti momenti: reclutamento del paziente sulla base di accertamento clinico e/o strumentale positivo; anamnesi personale e familiare; esami di laboratorio (con procedura step by step).

**SCOPO DELLO STUDIO** Valutazione dell'affidabilità e dell'efficacia diagnostica del protocollo, in particolare qualora applicato in corso di evento acuto, prima del trattamento farmacologico. **CASISTICA:** 75 soggetti (34 F, 41M) di età compresa tra i 20 e gli 88 anni. 30 soggetti reclutati con diagnosi di trombosi arteriosa, 45 soggetti con diagnosi di trombosi venosa.

**MATERIALI E METODI** Gli esami PT, PTT, FBG secondo Clauss, PC, PS, APC Res, AT III, LAC, T. di caolino, test di conferma con materiale ricco di Fosfolipidi sono stati eseguiti con apparecchiatura STAGO e kit della Ditta Roche. La ricerca degli Ab-anticardiolipina e Ab-antiBeta2-glicoproteina-1 con kit della Ditta Biotin. Il dosaggio di Omocisteina con kit della Ditta Abbott.

**RISULTATI** Nei casi di trombosi arteriosa abbiamo osservato: anamnesi familiare positiva in 9 casi; eventi acuti in atto: 13; indagini di laboratorio: almeno un test positivo in 8 casi (26%): 4 Ab-anticardiolipina, 2 omocisteina, 2 LAC, 1 PS, 1 AT III

Nei casi di trombosi venosa: anamnesi familiare positiva in 10 casi; eventi acuti in atto: 20; indagini di laboratorio: almeno un test positivo in 26 casi (58%): 6 Ab-anticardiolipina, 11 omocisteina, 7 LAC, 2 PS, 3 AT, 1 APCR. La positività al test per APC Res è stata successivamente confermata dal riscontro di FV Leiden in forma omozigote.

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI** Il protocollo in uso ha evidenziato una notevole differenza, in termini di efficacia nella ricerca di marcatori biochimici di rischio tromboembolico, tra la patologia del distretto venoso e quella del distretto arterioso (58% vs 26%). Riteniamo comunque fondamentale, anche ai fini di evitare spreco di risorse, porre l'accento sull'importanza di un corretto e coerente reclutamento, supportato da approfondite indagini cliniche ed anamnestiche. Gli accertamenti eseguiti in corso di evento acuto, per quanto discutibili, hanno nel nostro caso consentito di avanzare un'ipotesi eziopatogenetica in 16 dei 33 casi indagati (48 %). Segnaliamo che uno dei casi di TV negativo, a successive indagini presso altro Centro è risultato positivo per Protrombina mutata G20210A. La discussione dei risultati ottenuti ci induce ad ipotizzare una riformulazione del protocollo.

**BIBLIOGRAFIA:** Palareti G., Legnani C.: Screening delle trombofilie Linee guida 1999

## CONGENITAL AND ACQUIRED ACTIVATED PROTEIN C RESISTANCE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Micelli M., Ranieri P., Cicinelli E., Pinto V., Galantino P., Vitellio L.

Coagulation Laboratory - Azienda Ospedaliera Policlinico, Bari; Menopausal Center - 1<sup>st</sup> Department Ob/Gyn-University of Bari

**Background:** Menopause, regardless of age at onset, is associated with an increase in cardiovascular diseases (CVD), in both arterial and venous sites. Hormone replacement therapy (HRT), undertaken to prevent some secondary effects associated to the postmenopausal period, has been pointed out as a prothrombotic factor. Activated protein C resistance (APCR) is the most common hereditary coagulation abnormality. In the majority of cases it results from a point mutation Arg506→Gln of the factor V gene. Recently has been outlined that also acquired APCR is associated with activation of blood coagulation and is a risk factor for thrombosis; a dose-response relationship has been observed between the sensitivity for APC and the risk of thrombosis. The objective of this study was to assess the prevalence of congenital and acquired APCR in a population of postmenopausal women (PMW) attending a public Menopausal Center (MC) and their association to the traditional biological risk factors for CVD.

**Methods:** We analysed 740 consecutive PMW, referred to the MC of the University of Bari. APCR test was performed with the conventional method and the one in five dilution in factor V deficient plasma employing the APTT-based assay (Chromogenics, Sweden). The clotting times were presented as normalized ratio (NR) with a cut-off value of 0.8. DNA analysis for Arg506→Gln was performed with Polymerase chain reaction followed by digestion of amplified products with the restriction enzyme Mnl I. The prevalence of total cholesterol, HDL and LDL cholesterol, triglycerids, fibrinogen, body mass index, smoke, hypertension, familiarity for arterial or venous thrombosis was compared in the three groups of congenital, acquired and normal APCR.

**Results:** The prevalence of congenital APCR was higher than in the general apulian population (400 normal subjects studied: 265 males and 135 females; our published data): 3,5 % in PMW vs 1,8%; p=0,13. The prevalence of acquired APCR was 2,5%. No difference was found for the prevalence of any of the biological risk factors for CVD examined in the three groups of congenital, acquired and normal APCR.

**Conclusions:** The 2,5 % prevalence of acquired APCR along with the 3,5% of congenital APCR suggest the opportunity to assess APCR in women who must undergo HRT both with the conventional and the Factor V modified method.

Lowe G et al. *Thromb Haemost* 2000; 83(4):530-5

## INCREASED FREQUENCY OF PLA2 ALLELE OF THE PLATELET GLYCOPROTEIN RECEPTOR GENE IN SARDINIANS CENTENARIANS

Pes G.M.<sup>1</sup>, Carru C.<sup>1</sup>, Sini M.E.<sup>1</sup>, Cascioni M.<sup>1</sup>, Castagni A.<sup>1</sup>, Errigo A.<sup>1</sup>, Franceschi C.<sup>2</sup>, Baggio G.<sup>3</sup>, Deiana L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of Clinical Biochemistry; University of Sassari, viale S. Pietro 43/ b -07100 SASSARI-Italy; <sup>2</sup>Dept. of Medical Biosciences, University of Bologna; <sup>3</sup>Dept. of Internal Medicine, Azienda Ospedaliera di Padova, Italy

Previous studies have demonstrated hypercoaguability in oldest olds even in absence of manifest thrombosis. A common Leu33Pro polymorphism (PLA1/A2) of the platelet glycoprotein IIIa receptor has been reported to influence platelets aggregation [1]. The allele PLA2 is supposed to play a role in the individual susceptibility to coronary thrombosis and premature death. To assess the importance of this polymorphism in survival at old age we determined the PLA genotype in 134 centenarians (M=45, F=89) recruited during the AKEA study, a population-based survey of all centenarian living in Sardinia. One hundred fifty normal subjects 60±1 years-old were also recruited as controls. The PLA genotyping was performed by PCR followed by restriction with *MspI*.

The genotype frequencies were PL A1/A1 58.5%, A1/A2 34.0%, A2/A2 7.5% in centenarians and PL A1/A1 73.7%, A1/A2 23.7%, A2/A2 2.6% in controls. Therefore, in comparison with the control group the frequency of the PLA2 allele was paradoxically higher in centenarians than in younger controls (0.245 vs 0.145, p=.022). After stratification by gender the frequency of the 'unfavorable' PLA2/A2 genotype appeared 4-fold higher among centenarian women (9.8%) than in controls of the same gender (2.1%). Accordingly, the odds ratio of PLA2 for survival to 100 years in women was 1.91 (95% CI 1.09 – 3.35, p=0.063).

Our results suggest that PLA2 allele, which has previously been associated to an increased risk of thrombosis at a younger age, may be present even in the oldest old. However, at an extreme age this allele does not appear to be harmful, probably because of the interaction with other genetic and/or environmental factors counterbalancing its possible detrimental effects.

[1] Weiss EJ et al. *N Engl J Med* (1996); 334: 1090-4

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FACTOR VIII GENE: PRELIMINARY RESULTS

Frusconi S.<sup>o</sup>, Girolami F.<sup>o</sup>, Linari S.\*<sup>o</sup>, Masieri M.<sup>o</sup>, Passerini I.<sup>o</sup>, Morfini M.\*<sup>o</sup>, Torricelli F.<sup>o</sup>

\*Centro di Riferimento Regionale per le Coagulopatie Congenite. Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

<sup>o</sup>U.O. di Citogenetica e Genetica. Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

On November 1999 we started studying factor VIII gene in hemophiliacs attending the Haemophilia Centre of Florence and we have already characterized 53 DNA samples: 29 patients and 24 female relatives. Twenty-three patients suffered from severe Haemophilia A and 6 had mild to moderate disease. However, a comprehensive analysis of mutations has been difficult because of the large gene size, its many scattered exons, and the high frequency of *de novo* mutations.

The first step of gene analysis was Long-PCR to evaluate Intron 22 inversion, disrupting factor VIII gene. In our samples we found that 15/29 patients were inverted. After PCR amplification, we performed Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) on 14 DNA negative samples. Heteroduplex samples were sequenced directly by Abi Prism 377 and by Abi Prism 310.

In this way all evaluated patients and their female relatives were characterized. We have found 9 already described mutations and 6 novel mutations. Eight out of 24 relatives were carriers of Intron 22 inversion and 9 were heterozygote for point mutation.

All carriers could take advantage of prenatal diagnosis as we have already done on a chorionic villus sample. A family study of all patients attending our Haemophilia Centre is still ongoing.

At the moment we are screening 50 new patients and the Haemophilia Centre of Florence is collecting other DNA samples.

### Reference:

"Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis". Tagariello G. et al (Haematologica 2000; 85:525-529).

## MARKERS OF HYPERCOAGULABILITY AND PROC GLOBAL AS SCREENING TEST FOR THROMBOPHILIA

De Lucia D.(1), Maisto G. (1), Del Giudice V. (1), Marotta R. (1), De Francesco F. (1), Rapacciuolo L. (1), Papa M.L. (2) and Dente B. (3)

(1) Institute of General Pathology, Laboratory of Haemostasis and Thrombosis; II University of Naples. (2) Hemophilia and Thrombosis Center, San Giovanni Bosco Hospital; Naples. (3) Laboratory of Clinical Pathology; San Paolo Hospital, Naples.

Thrombosis is a multicausal disease. In most cases two or more risk factors both genetic and acquired are necessary before thrombotic event occurs. Such a combination of risk factors are hyperhomocysteinemia ( $> 14.5 \mu\text{mol/L}$ ), high FVIII:C levels ( $> 155 \text{ IU/dL}$ ) or high levels of FII ( $117.5 \text{ IU/dL}$ ). It is mandatory to have a screening assay which is able to recognize this combination of defects. The aim of our study was to determine the sensitivity of ProC Global assay to fulfil such demand on a screening test.

ProC Global (Dade Behring) is a coagulometric assay measuring the prolongation of an APTT induced by activation of Protein C (PC) in the sample. The results are expressed as normalized ratio (NR) or as modified normalized ratio (mNR) using a calibrated normal plasma pool as reference. While NR uses the ratio between the APTT with and without PC activation, mNR uses the difference between both. The results are correlated with levels of homocysteine (HPLC with fluorimetric detection) and the FVIII:C and FII (coagulometric determination; Instrumentation Laboratory). We have investigated 150 patients with hyperhomocysteinemia ( $> 14.5 \text{ mmol/L}$ ), aged  $51.5 \pm 15.5$  years, high FVIII:C  $> 155 \text{ IU/dL}$  in 80 patients, high FII  $> 117.5 \text{ IU/dL}$  in 17 patients; both factors are elevated in 11 patients. Patients with FV R506Q mutation and PC/PS deficiencies are excluded from the study.

It is possible to detect patients with above mentioned combination of the three risk factors in the ProC Global assay. The sensitivity as function of mNR and NR varied between 92.3% (mNR with cut-off 0.75) and 78% (NR with cut-off 0.80). The sensitivity for the combination of the two risk factors homocysteine and elevated FVIII:C levels is 81.5% (mNR) and 76% (NR), for homocysteine and elevated FII the sensitivity is 85% and 74%, respectively. Among investigated subjects (1455) with thrombophilia we found a high percentage of patients with combined defects. The ProC Global as general screening tests for the whole PC-pathway is able to recognize other thrombogenic risk factors additionally, especially the combination of high levels of homocysteine, FVIII:C and FII.

RESISTANCE TO ACTIVATED PROTEIN C CORRELATES WITH ACA IgG AND ANTI $\beta$ 2GPI IgG

De Lucia D.(1), Maisto G. (1), Del Giudice V. (1), Marotta R. (1), De Francesco F. (1), Rapacciuolo L. (1), Papa M.L. (2) and Dente B. (3)

Institute of General Pathology, Laboratory of Haemostasis and Thrombosis; II University of Naples. (2) Hemophilia and Thrombosis Center, San Giovanni Bosco Hospital; Naples. (3) Laboratory of Clinical Pathology; San Paolo Hospital, Naples.

Recent evidences have shown that resistance to activated protein C (APCR) may be due not only to FV R506Q mutation but also to immunologic disorders (APCRresistance phenotype).

In order to evaluate whether the presence of LAC syndrome, ACA (IgG and M) and anti  $\beta$ 2GPI (IgG) antibodies could be associated with the APCRresistance phenotype, we studied 50 LAC patients diagnosed according to SSC ISTH criteria. Forty-five out of fifty had a previous history of venous (28) or arterial brain (13) thrombosis or fetal losses (4). We carried out the original and the modified (plasma diluted 1:5 in FV depeleted plasma) APCR APTT based assays (Instrumentation Laboratory). We found that the prevalence of APCR original phenotype was significantly higher in patients with ACA (+) IgG and anti  $\beta$ 2GPI (+) (24/25) than in those patients ACA (-) IgG and anti  $\beta$ 2GPI (-) (1/25). The ACA (+) IgG and anti  $\beta$ 2GPI (+) group showed a mean APCR ratio significantly lower than tha ACA (-) IgG and anti  $\beta$ 2GPI (-) group ( $p < .001$  and  $p = .002$  with the original and modified technique, respectively). The APCR phenotype was lost in 17/25 and showed borderline values in the other 8 patients using the modified technique. A linear correlation between ACA IgG vs original APCR ratio ( $r = -0.75$ ) was found. However, when the analysis was limited to those patients with an abnormal APCR ratio, the correlation was increased ( $r = -0.86$ ). we also found a linear correlation when plotting log anti  $\beta$ 2GPI vs log APCR ratio.

The authors feel that the APCR ratio phenotype seems to be strongly associated to ACA IgG and anti  $\beta$ 2GPI and not merely due to the presence of LAC. Finally, the inverse correlation between APCR ratio and the titer of ACA IgG and anti  $\beta$ 2GPI, suggests an effect of these antibodies on the APC phospholipid-dependent inactivation of FVa.

## INTERAZIONI PIASTRINA-BIOMATERIALE MEDIATE DAL COMPLESSO RECETTORIALE GPIIbIIIa

\*Savini F., \*Tresca E., \*Di Claudio L., \*Marucci A., \*Mauriello V., \*Palmucci Z., \*\*Nubile G.

\* Laboratorio Analisi P.O. Penne – Pescara

\*\* Laboratorio Analisi P.O. Ortona - Chieti

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare le modificazioni del complesso recettoriale GPIIbIIIa in risposta a debris di titanio provenienti da artroprotesi. Le interazioni piastrina-biomateriale, piastrina-endotelio e piastrina-piastrina, mediate dal complesso GPIIbIIIa, innescano una serie di reazioni biochimiche in grado di trasformare localmente una risposta emostatica in un processo trombotico (1). Il complesso GPIIbIIIa, (2) è un recettore di attivazione presente sulle piastrine circolanti non attivate. Con l'attivazione piastrinica da parte dei debris di titanio, si assiste a variazioni del complesso glicoproteico GPIIbIIIa con formazione di recettori capaci di legare il fibrinogeno. Le piastrine attivate, inoltre, promuovono l'amplificazione e la strutturazione del fenomeno mediante la formazione di un reticolo di fibrina localizzata che stabilizza la costituzione del trombo. Le particelle di titanio puro (John Matthey-Danvers, Massachusetts) usate per gli esperimenti avevano un diametro inferiore a  $3\mu\text{m}$  e la loro concentrazione era pari a  $2.0 \times 10^7$  particelle/ml. Le variazioni del complesso recettoriale GPIIbIIIa sono state valutate usando l'anticorpo monoclonale CD41a (Immunotech). Gli esperimenti *in vitro* sono stati condotti su piastrine provenienti da sangue intero di 15 donatori. I risultati ottenuti hanno dimostrato un significativo incremento ( $p < 0.001$ ) dell'espressione del CD41a. Questo aumento dell'espressione del CD41a da parte delle piastrine in risposta ai debris di titanio, è da ritenersi interessante per il ruolo svolto dal complesso recettoriale GPIIbIIIa nella coagulazione (3) dei pazienti protesizzati.

1) Born GVR, Cross HJ. The aggregation of blood platelets. J. Phys. 1963; 5:168-173.

2) Berndt MC, Word CM, De Luca M. The molecular mechanism of platelet adhesion. J. Med. 1995; 25:822-30.

3) George JN, Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activates platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. J. Clin. Invest., 1986, 78:340-348.

## STANDARD DI PRODOTTO E INDICATORI DI QUALITÀ: L'ESPERIENZA DEI LABORATORI DELL'AZIENDA OSPEDALIERA DI MODENA

Carbonieri A., Baraldi E., Castellana N., Mantovani G., Venturelli C., Vecchi C., Baraghini G.F.

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

Nell'ambito della implementazione del sistema qualità dell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena è stato elaborato e presentato uno standard di prodotto delle prestazioni di laboratorio, in cui sono dichiarati i tempi di consegna referto per i degenti e per i pazienti ambulatoriali. Ai fini di garantire il rispetto degli impegni assunti con l'utenza esterna attraverso questo documento, è stato allestito un monitoraggio che tenesse conto della particolare complessità dell'area, che è costituita da 6 laboratori, ciascuno con un proprio sistema informativo gestionale e quindi con processi produttivi paralleli dalla prenotazione fino alla refertazione. I 6 Laboratori sono serviti da un Centro Prelievi che, con un software creato ad hoc per gestire in modo integrato le informazioni di ciascun paziente (etichette, foglio di ritiro referto, prenotazioni, diagnosi, referti), dopo l'effettuazione del prelievo, distribuisce campioni e prenotazioni alle diverse sedi.

I referti, validati nei 6 laboratori, sono ricevuti on line dal C.P. che stampa i casi completi per paziente, consegnandoli all'Ufficio Informazioni che li distribuisce tutti i giorni con orario continuato.

Per presidiare i momenti critici del processo sono stati predisposti dei moduli dove si registrano ogni giorno i pazienti per i quali non è disponibile il referto entro i tempi previsti dallo standard di prodotto.

I casi di non conformità vengono attribuiti ad una delle seguenti categorie:

- a) incompleto (disguidi della fase analitica)
- b) non inviato (disguidi della fase post-analitica)
- c) in ripetizione (revisione tempi di risposta)
- d) non trovato all'Ufficio Informazioni (organizzazione)

Mensilmente viene fornita a tutti i Servizi coinvolti (Laboratori, Ufficio Informazioni e DS) una sintesi dei problemi suddivisa per laboratorio e per tipologia di disguido, fornendo così gli strumenti per approfondire l'analisi dei casi e attivare opportune azioni correttive.

Il confronto dei dati annuali (99-00) ha portato al riconoscimento della efficacia degli indicatori scelti: sono infatti stati evidenziati, a fronte di un incremento di attività del 7,4 %, un miglioramento del servizio offerto al paziente (n.°incompleti 652-432), ma anche una conferma di sofferenze e criticità dell'area amministrativa e informatica (n.°non inviati 220-500).

### Bibliografia:

F.Focarile Indicatori di Qualità nell'assistenza Sanitaria  
Centro Scientifico Editore, 1998.

## ACCREDITAMENTO PROFESSIONALE: CALO DI ATTENZIONE DOPO LA VISITA ISPETTIVA. IMPORTANZA DEL CORSO PER ISPETTORI INTERNI DI SISTEMA QUALITÀ APL

Zepponi E., Franchi B., Gentileschi E., Ursicino N., Giovannelli F., Tamagnini K., Angelucci C., Del Signore R., Ferri L., Guadagnoli A., La Grotteria V., Pellegrini F., Troili A.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia  
Ospedale Civile "S.Camillo de' Lellis" - Rieti

Il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Rieti, in accordo con la Direzione Aziendale della ASL, ha iniziato ad implementare un Sistema Qualità seguendo gli standard del Clinical Pathology Accreditation (CPA-UK) nell'autunno del 1998. La pianificazione è stata la seguente:

1. Formazione del personale;
2. Conoscenza standard
3. Visita iniziale
4. Inventario documentazione
5. Stesura documentazione
6. Verifica Interna
7. Domanda accreditamento

Nel dicembre 1999 veniva inoltrato al CPA l'application form per richiedere l'accreditamento.

Il 3 maggio 2000 gli Ispettori del CPA effettuavano la visita e l'8 giugno 2000 il CPA comunicava che lo stato del laboratorio era: "Approvazione condizionata CPA" sino al 1.giugno.2001. Entro tale dovevano essere corrette le non conformità riscontrate. Dopo la visita il livello di adesione agli standard e l'attenzione ai problemi della qualità cominciò a scendere. La direzione del laboratorio decise di chiedere all'Associazione Interdisciplinare per la Qualità e l'Accreditamento Professionale dei Laboratori Clinici (APL) l'organizzazione di un corso per Ispettori Interni di Sistema Qualità nel Laboratorio Clinico. Il corso si è tenuto il 4 e 5 dicembre 2000 e l'esame relativo il 17 gennaio 2001. Il coinvolgimento di 7 tecnici e 4 laureati ha contribuito a risollevere l'attenzione verso il Sistema Qualità. Attualmente tutta l'equipe sta lavorando alla correzione delle non conformità per ottenere l'accreditamento senza condizioni da parte del CPA.

### Bibliografia:

1. Plebani M. Sistema qualità ed accreditamento nel laboratorio clinico. Storia, Esperienze e Prospettive  
Biomedica Source Books, 1998

## LA VARIABILITÀ BIOLOGICA, I TRAGUARDI ANALITICI E LA CHIMICA SECCA

Angelini G., Rulli A., Romano C., Nubile G.

Laboratorio Analisi SS Annunziata Via dei Vestini Chieti 66013

L'utilizzo della variabilità biologica rappresenta oggi un criterio ampiamente accettato per definire i TA necessari per valutare l'imprecisione e l'inaccuratezza dei risultati di laboratorio (1).

Nell'adottare tale criterio ci siamo inizialmente preoccupati di reperire i dati della VB dei costituenti sierici da noi analizzati, Ricos ed altri (2).

I dati relativi alla nostra imprecisione e alla nostra inaccuratezza sono stati estrapolati dal CQI e dal CQA ottenuti con sieri a due livelli della ditta Biorad nell'anno 2000, su analizzatore di chimica secca (Vtros 950) della ditta ORTHO Clinical Diagnostic.

Dal confronto delle nostre performance rispetto ai TA "desiderabili" solo per il Ca, CKMB, Mg e Pt i nostri livelli di Imprecisione e/o Inaccuratezza sono più elevati. Tuttavia, considerando che per questi analiti il raggiungimento di tali traguardi risulta essere obiettivamente difficile, abbiamo adottato Ta "minimi", anch'essi definiti in base alla VB, rispetto ai quali i nostri livelli di errore risultano essere più accettabili. Il lavoro, inoltre, amplia la tabella base con i calcoli delle differenze critiche di imprecisione (SE) ed inaccuratezza (RE) che verranno utilizzati per definire le regole di controllo.

La tabella riporta i dati di alcuni analiti sierici oggetto del nostro lavoro.

Analit			I %	I%	B%	B%
	CVw	CVg	trov	desid	trov	desid
Amyl	9.5	29.8	5.7	4.8	2.29	7.8
ALT	24.3	41.6	8.5	12.2	0.98	12
AST	11.9	17.9	2	6	1.69	5.4
P.Alk	6.4	24.8	2.8	3.2	4.46	6.4
Ca	1.9	2.8	2.4	1	1.49	0.8
etc						

1) Franzini C. La variabilità biologica costituisce una utile guida per la definizione dei traguardi analitici, e per una migliore valutazione dei risultati di laboratorio espressi in forma numerica. *Biochim Clin* 1992;16:747-54

2) Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. "Current databases on biologic variation: pros, cons and progress" *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.

## VERIFICA DELLA ACCURATEZZA DEI METODI ROUTINARI DI DETERMINAZIONE DELLA CREATIN CHINASI (CK)

Ferrero C.A., Guerra E., Carobene A., Ceriotti F., Bonini P.A.

Laboratorio di Standardizzazione, H S Raffaele, Milano

La maggioranza dei Produttori di diagnostici i cui reattivi vengono utilizzati dai laboratori iscritti al Programma di VEQ PROLARIT dichiara che la formulazione dei reattivi per la determinazione dell'attività della CK è conforme a quella proposta dalla IFCC. A tutti i materiali del PROLARIT viene assegnato un valore target (TV) con Metodo di Riferimento manuale IFCC recentemente ridefinito per consentire l'assegnazione di un TV a 37°C. Sulla base dei risultati ottenuti nei primi cinque esercizi del 2° ciclo PROLARIT abbiamo voluto esaminare il livello generale di accuratezza dei sistemi maggiormente rappresentati. Per i metodi caratterizzati da maggiore numerosità è stato anche eseguito uno studio di commutabilità per valutare in quale misura i risultati ottenuti sui materiali del Progetto fossero effettivamente rappresentativi del comportamento sui sieri dei pazienti.

**Risultati:** Analizzando tutti i risultati (N=852, con esclusione dei dati al di fuori delle 3 DS) ottenuti in 5 diversi esercizi dai laboratori che dichiarano di utilizzare un reattivo IFCC, risulta evidente una marcata sottostima media (-18.9%) rispetto al TV. Tale sottostima è particolarmente marcata alle concentrazioni più basse (-25.9% sul campione con TV pari a 43.7 U/L) e un po' più contenuta alle concentrazioni più elevate (-11.4% nel campione a 357.7 U/L). La sottostima risulta significativamente più marcata nei sistemi con formulazione monoreattivo (-22.4%; 174 risultati da un numero medio di laboratori pari a 17) rispetto ai sistemi bireattivo (-15.7%; 446 risultati da una media di 44 laboratori). Il dato dei sistemi bireattivo, risulta peraltro fortemente differenziato tra i vari produttori risultando molto vicino al traguardo analitico di inaccuratezza del componente ( $\pm 11.9\%$ ) per alcuni gruppi di metodo (Roche -13.7%, Beckman -12.3%) e decisamente più distante per altri (Biosystems -32.5%; Dade -28.6%; IL -36.3%). Lo scarto medio del gruppo Vitros, da considerare a parte in quanto appartenente al gruppo "dry chemistry", risulta pari a -14.2%. Limitatamente ai gruppi Vitros e Roche si è potuta dimostrare la pressochè totale assenza di fenomeni di non-commutabilità dei liofilizzati.

**Discussione:** anche i metodi che, come il metodo IFCC, utilizzano il creatin-fosfato come starter della reazione, risultano affetti da una sensibile sottostima. Di conseguenza, pur con la cautela suggerita dalla disponibilità di dati sulla commutabilità dei materiali per soli due gruppi di metodo, sarebbe auspicabile che i produttori di kit, procedano ad un riesame della accuratezza dei propri sistemi per consentire un loro allineamento al Metodo di Riferimento recentemente modificato.

PROTEINE SPECIFICHE: STIMA DELLA VARIABILITÀ INTERLABORATORIO MEDIANTE UN PROGRAMMA DI VEQ

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

Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto, TV

Il Programma di VEQ per Biochimica Clinica su Siero del Centro di Ricerca Biomedica, CRB, (175 partecipanti) prevede l'analisi di 11 proteine specifiche: albumina,  $\alpha_1$ -glicopr. acida, aptoglobina, transferrina, IgA, IgG, IgM, ceruloplasmina, PCR, C3 e C4.

Scopo di questo lavoro è quello di analizzare la variabilità interlaboratorio dei 135 partecipanti al ciclo 2000 che hanno dosato tali proteine: il 55% con metodi nefelometrici (dei quali l'85% utilizzava un calibratore standardizzato secondo il materiale di riferimento della IFCC, CRM 470/RPPHS 5, mentre il 15% usava ancora un sistema di calibrazione non standardizzato IFCC), il 42% con metodi turbidimetrici ed il 3% con altri metodi (RID).

A titolo di esempio, nella tabella, sono riportati i risultati della variabilità interlaboratorio relativa ad alcune proteine, ottenuti su quattro campioni di controllo a diversa concentrazione, sia per metodo omogeneo (principio analitico) che per sistema diagnostico (Strumento, Kit, Calibratore).

Variabilità interlaboratorio (media dei CV%)							
Proteine Metodi	n	TRF	IgA	IgG	IgM	C3	C4
		113	128	128	128	101	101
<b>Nefelometria</b>		<b>7.2</b>	<b>6.3</b>	<b>5.6</b>	<b>6.1</b>	<b>5.7</b>	<b>6.7</b>
<i>Beckman</i>		6.2	4.9	3.6	7.0	4.7	8.7
<i>Dade-Behring</i>		6.2	6.8	5.3	4.0	5.1	4.7
<b>Nef. non IFCC</b>		<b>9.6</b>	<b>6.8</b>	<b>5.3</b>	<b>4.0</b>	<b>5.0</b>	<b>4.1</b>
<b>Turbidimetria</b>		<b>14.5</b>	<b>12.8</b>	<b>11.6</b>	<b>12.3</b>	<b>9.9</b>	<b>9.8</b>
<i>Turbitimer</i>		11.8	7.8	8.5	12.2	8.3	8.3
<i>Hitachi</i>		4.2	6.2	4.8	7.7	3.8	3.8
<i>Integra</i>		4.0	1.7	2.8	4.1	2.7	5.8
<b>Turb. non IFCC</b>		<b>14.8</b>	<b>17.2</b>	<b>11.9</b>	<b>7.6</b>	-	-

Dall'analisi dei risultati emerge come la variabilità interlaboratorio sia sufficientemente contenuta. Si osserva inoltre come i metodi turbidimetrici presentano CV% più alti di quelli nefelometrici, dovuti essenzialmente alla variabilità del Turbitimer e al suo bias rispetto agli altri sistemi. La diminuzione della variabilità analitica interlaboratorio osservata rispetto ai cicli di VEQ precedenti, è essenzialmente riconducibile al processo di standardizzazione operato dalle ditte produttrici mediante l'adozione del CRM 470 per cross-calibrare i loro standard commerciali. Il valido supporto fornito dal CRB durante il passaggio al nuovo tipo di calibrazione (spesso i laboratori fornivano risultati o IR non conformi al sistema di calibrazione dichiarato) ha facilitato l'omogeneità dei risultati ed ha promosso l'uniformità degli IR per le proteine.

*J Clin Lab Anal* 1994; 8:177-90.

ESPERIENZA DI CERTIFICAZIONE DI UNA STRUTTURA POLIFUNZIONALE PRESSO L'OSPEDALE DI STATO DI SAN MARINO

Casali F., Zani A., Fantini G.F., Moretti M., Muccioli F., Nocentini F., Ragni M., Stacchini M.A., Turchi U., Zanotti L.

Laboratorio Analisi/Centro Trasfusionale, Ospedale di Stato della Repubblica di San Marino.

Nel 1998 il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Stato della Repubblica di San Marino ha elaborato un "Progetto per il miglioramento della Qualità", finalizzato alla implementazione, nell'arco di tre anni, di un sistema qualità, secondo le norme UNI EN ISO 9002, in grado di essere applicato su tutte le attività del Servizio.

Questo Laboratorio presenta infatti una struttura organizzativa di tipo dipartimentale dal momento che ad esso afferiscono non solo i tradizionali settori di biochimica clinica, immunometria ed ematologia, ma anche il settore di microbiologia ed il Centro Trasfusionale. La complessa articolazione del Servizio e le diverse tipologie organizzative e metodologiche presenti hanno quindi reso necessario sviluppare un progetto particolarmente elaborato che, pur nella unitarietà del suo impianto, fosse in grado di garantire flessibilità applicativa e rispondenza alle diverse esigenze. Ciò ha richiesto fin dalle prime fasi della sua stesura la partecipazione attiva ed il coinvolgimento di tutto il personale del Servizio ed ha portato alla successiva definizione di un gruppo di lavoro ampio e ben rappresentativo non solo dei diversi settori di attività, ma anche delle diverse figure professionali. Raggiungere un coinvolgimento totale e partecipato di tutto il personale, trasformandolo in un gruppo proteso e motivato al miglioramento ha dunque rappresentato non solo una condizione essenziale per lo sviluppo del progetto, ma ha finito per costituirne anche uno degli elementi caratterizzanti ed uno degli obiettivi professionalmente più significativi. Tale impostazione ha inoltre consentito di realizzare un progetto già predisposto a recepire ed attuare molti degli orientamenti presenti nelle VISION 2000, soprattutto per quanto concerne la valorizzazione delle risorse umane. Nell'ambito del progetto sono stati identificati cinque obiettivi considerati come strategici: 1) garanzia della qualità tecnica delle prestazioni erogate dal Servizio; 2) soddisfazione dei diritti e delle aspettative dell'Utente; 3) migliore utilizzo possibile delle risorse; 4) soddisfazione e sicurezza degli operatori; 5) disponibilità del prodotto a costi contenuti per il Laboratorio e a tariffe competitive. Tali obiettivi definiscono e sostanziano il progetto collegandolo operativamente al Sistema Qualità che ne rappresenta dunque lo strumento attuativo.

Il Sistema Qualità scaturito dal progetto ed applicato a tutti i settori del Laboratorio Analisi/Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Stato della Repubblica di San Marino è stato completato nell'ambito di tempo previsto ed è stato certificato dalla Det Norske Veritas, il 24 gennaio 2001.

## ERRORI NELLA FASE PRE-ANALITICA: RISULTATI DI UN SISTEMA DI MONITORAGGIO

Cerioti F., Franciosi M., Spina A., Bonini P.A.

Istituto Scientifico H. S. Raffaele, Laboratorio Analisi, Via Olgettina 60, 20132 Milano

**Introduzione.** Il mettere in atto un sistema qualità nell'ambito del Laboratorio analisi deve avere come scopo principale quello di migliorare le prestazioni fornite al paziente. Uno dei cardini del miglioramento è costituito dalla rilevazione degli errori. Una delle maggiori fonti di errore è rappresentata dalla fase pre-analitica.

Per monitorare al meglio i problemi inerenti i campioni biologici è stato messo in atto presso il nostro laboratorio un sistema automatico di rilevazione di tutti quei casi in cui il risultato analitico non si è potuto fornire a causa di un problema pre-analitico.

**Materiali e metodi.** Sono stati definiti un certo numero di commenti codificati per standardizzare la registrazione degli errori. Questi commenti sono inseriti al posto del risultato nel caso in cui esista un determinato problema. A intervalli mensili, con una apposita interrogazione del data-base, questi codici vengono estratti e classificati.

**Risultati.** Nel corso del primo semestre 2000 complessivamente 8224 risultati su 2.411.452 (0.34%) non sono stati refertati a causa di problemi pre-analitici. Dei risultati mancanti 7723 erano per pazienti ricoverati (0.58% degli esami richiesti), mentre 492 (0.046%) erano di pazienti ambulatoriali. I numeri indicati non si riferiscono ai campioni (provette), ma ai risultati (ad es. un singolo campione emolizzato può provocare la mancanza di 20 risultati). Nel caso dei pazienti ricoverati il problema più comune era rappresentato dai campioni emolizzati (4523 risultati mancanti a causa dell'emolisi eccessiva) seguito da "campione insufficiente" (1350), da "campione scorretto" (821) e da "campione coagulato" (421). Queste prime 4 cause sono responsabili da sole del 92% dei problemi.

Nel caso di pazienti ambulatoriali l'errore pre-analitico più frequente era rappresentato dal "campione scorretto" (178) riferito prevalentemente a campioni di urina, feci ed escreato che sono portati dai pazienti. Le altre cause di mancata refertazione erano dovute a "campione emolizzato" (164), "campione insufficiente" (57) e "campione coagulato" (52). Anche in questo caso le prime 4 tipologie sono responsabili del 91.7% dei problemi.

**Conclusioni.** La frequenza 10 volte maggiore dei problemi pre-analitici fra i ricoverati indica che sicuramente in questa area ci sono spazi notevoli per il miglioramento. Solo però quando si hanno dati oggettivi sono possibili interventi mirati e solo attraverso il monitoraggio continuo di questi dati si può verificare l'efficacia delle azioni correttive messe in atto.

## È SUFFICIENTE UTILIZZARE KIT OTTIMIZZATI IFCC PER OTTENERE DATI ACCURATI?

Guerra E., Ferrero C.A., Carobene A., Baggio E., Maritato C., Ceriotti F., Bonini P.A.

Laboratorio di Standardizzazione per la Chimica Clinica, HS Raffaele

**Introduzione:** Un presupposto importante che permetta di ottenere valori di attività enzimatica confrontabili con i metodi di riferimento è quello di utilizzare reattivi che siano essi stessi ottimizzati secondo le specifiche IFCC. Tra i laboratori aderenti al 2° ciclo del Programma di VEQ in Biochimica Clinica PROLARIT solo 20 su 88 utilizzano metodiche formulate in accordo con il metodo di riferimento per la GGT. Nel caso di ALT e AST invece molti risultano definiti come "IFCC" (70 su 120), ma in modo improprio in quanto non includono Piridossal Fosfato (PLP) nella composizione del reattivo. I laboratori che utilizzano il metodo IFCC con PLP sono solo 14 e 13 rispettivamente. Lo scopo di questo lavoro è di verificare in quale misura una formulazione del reattivo secondo IFCC sia in grado di consentire l'ottenimento di risultati sovrapponibili a quelli del corrispondente Metodo di Riferimento.

**Risultati:** La tabella riporta il Bias % medio rispetto al Valore di Riferimento ottenuto dai laboratori che dichiarano di utilizzare una ottimizzazione IFCC. A tale scopo, sono stati considerati i risultati di AST, ALT e GGT ottenuti su 10 materiali liofilizzati analizzati in occasione di 5 diversi esercizi.

	Labs	Bias medio	Bias min	Bias max
AST Plp	13	-5.2%	-10.3%	-1.0%
AST	70	-22.8%	-26.7%	-20.4%
ALT Plp	14	1.0%	-4.1%	6.6%
ALT	70	-4.0%	-8.2%	1.2%
GGT	20	-8.7%	-13.0%	-2.1%

I dati per AST ed ALT evidenziano che i risultati ottenuti con reattivi contenenti PLP sono affetti da un Bias% rispetto al valore di riferimento decisamente più contenuto di quanto non si abbia in assenza di PLP. Tuttavia va rilevato come lo scarto medio dal TV ottenuto per AST risulti superiore al traguardo analitico relativo alla massima inaccuratezza accettabile ( $\pm 4.5\%$ ). Per quanto riguarda invece GGT e ALT lo scarto medio dal TV, pur risultando più ampio, riesce a rientrare nei limiti di massima inaccuratezza accettabile ( $\pm 10.7\%$  e  $11.8\%$  rispettivamente).

**Conclusioni:** Sicuramente l'utilizzo di reattivi correttamente formulati resta un elemento fondamentale nell'assicurare la necessaria specificità e accuratezza di determinazione delle attività enzimatiche qui considerate. Non va tuttavia trascurata la necessità di studiare attentamente anche altri fattori quali l'applicazione strumentale e le modalità di calibrazione che possono pregiudicare l'ottenimento di una adeguata accuratezza di determinazione.

## DOCUMENTAZIONE MINIMA PER LA GESTIONE DELLA STRUMENTAZIONE DI LABORATORIO

SIBioC Sezione Piemonte – Gruppo di Lavoro ‘Sistema qualità: gestione della strumentazione’: Villani A.<sup>1</sup>, Baudino G.<sup>2</sup>, Carrara N.<sup>2</sup>, Cuttaia C.<sup>3</sup>, Franchi I.<sup>4</sup>, Garro C.<sup>2</sup>, Pianezza D.<sup>2</sup>, Scella S.<sup>5</sup>, Michelotti M.<sup>6</sup>, Mastarone P.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Ospedale Valdese di Pomaretto (TO); <sup>2</sup>Ospedale S. Croce Cuneo; <sup>3</sup>Ospedale S. Croce Moncalieri (To); <sup>4</sup>A. O. Molinette Lab. Microbiologia Torino; <sup>5</sup>Ospedale CTO Torino; <sup>6</sup>Ospedale Mauriziano Torino; <sup>7</sup>Ospedale M. Vittoria Torino

Scopi/obiettivi: Per gestire la strumentazione il laboratorio ha bisogno di una notevole tipologia di documenti, sia che voglia certificarsi secondo le norme ISO, sia per rispettare i criteri dell’accreditamento istituzionale. Lo scopo del gruppo, costituito da tecnici, è stato di definire dei modelli di documentazione di uso comune, sottoponendoli al vaglio e alla sperimentazione degli operatori.

Metodologia: Nella prima fase di attività è stata fatta un’analisi dettagliata della fase analitica identificando la necessità dei singoli documenti e il relativo livello nella scala documentale del sistema qualità.

Nella seconda fase gli operatori hanno confrontato differenti modelli di documenti definendo quelli ritenuti più adeguati alle necessità dei singoli laboratori.

Nella fase successiva i modelli sono stati sperimentati sul campo e ulteriormente migliorati.

Infine sono stati promossi degli incontri con laboratori non direttamente coinvolti nel gruppo allo scopo di migliorare i modelli definiti e diffonderne l’utilizzo.

Il gruppo di lavoro sta proseguendo la sua attività su altre aree della fase analitica.

Risultati: Sono stati definiti e sperimentati alcuni documenti di uso comune, sia istruzioni operative sia moduli di registrazione: inventario strumenti, istruzioni strumentali, registrazioni (operatore, manutenzione, reagenti ecc.). Questi modelli sono stati resi disponibili ai fini della preparazione all’accreditamento istituzionale.

Considerazioni conclusive: La documentazione necessaria alla corretta gestione della strumentazione, pur essendo ormai richiesta anche dalle leggi sull’accreditamento istituzionale, non è così capillarmente diffusa come sarebbe legittimo aspettarsi. L’attività del gruppo di lavoro ha permesso l’elaborazione e la sperimentazione da parte dei diretti operatori di documenti di uso comune, fornendo inoltre a chi ne facesse richiesta, un valido strumento di lavoro nel rispetto dei requisiti richiesti dall’accreditamento istituzionale.

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

## PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ A CONFRONTO: IL CASO DEL PSA

Melegari A.<sup>1</sup>, Fortuna A.<sup>1</sup>, Rossi F.<sup>1</sup>, Carbonieri A.<sup>1</sup>.

1) Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena

I Programmi di Valutazione Esterna di Qualità rappresentano uno strumento che consente di valutare la propria attività e di confrontarla con quella di altri laboratori partecipanti che utilizzano lo stesso metodo e/o metodi differenti. Tali programmi devono mantenere e rafforzare il loro ruolo di indicatore di efficacia dell’insieme delle procedure di Controllo di qualità adottate nel laboratorio.

Il Laboratorio Analisi Chimico Cliniche partecipa, da diversi anni, al programma di Valutazione Esterna di Qualità della Regione Emilia Romagna per il PSA Totale. Inoltre dal 1999 si è aderito al Programma VEQ IMMUNOsurvey realizzato dalla Medical Systems per lo stesso analita. Dopo un biennio di esperienza di quest’ultimo VEQ, si è voluto riportare i due diversi schemi VEQ per quanto concerne gli aspetti di elaborazione statistica e le peculiarità di ciascuno relativamente al dosaggio di questo analita.

La partecipazione a più di un programma di Valutazione Esterna di Qualità può costituire un utile mezzo per ottenere informazioni integrate di confronto stimolando ulteriormente a documentare eventuali interventi correttivi, instaurando un processo di verifica e di miglioramento basato sulla efficacia delle proprie prestazioni.

Riferimenti bibliografici:

Kruse R., Geilenkeuser WJ., Rhole G. (1998) Int. J Biol Markers. Oct-Dec; 13 (4): 238-40

Cohen R., Bizollon CA. (1991) Amn Ist Super Sanità ; 27 (3) : 503-10.

LA QUALITÀ DELLA FASE PREANALITICA:  
VALUTAZIONE DELLA TEMPERATURA E DEL  
TEMPO DI CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DI  
SIERO

Brescia V., Lovero R., Varraso L., Pansini N.

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

La necessità di fornire un dato analitico preciso ed accurato rende necessaria la valutazione e la conseguente codifica di corrette procedure atte a ridurre le variabili di tutte le fasi operative compresa quella preanalitica.

In laboratorio campioni di siero già analizzati sono conservati per eventuali ripetizioni. Il tempo e la temperatura di conservazione sono importanti variabili che possono influenzare la precisione della determinazione di un test ripetuto. Scopo del nostro lavoro è stato di monitorare le modificazioni dei test biochimici a differente tempo e temperatura di conservazione.

**Materiali e metodi:** Lo studio è stato condotto su due aliquote di un pool di sieri conservati, tappati, a 4 – 8 °C e 20 – 25 °C. Su ciascuna aliquota sono stati eseguiti n° 42 test biochimici (analizzatore AU 600-Olympus). Le determinazioni sono state eseguite ogni 12 ore nei primi tre giorni ed alla settima e decima giornata. Per ogni determinazione è stata eseguita la valutazione della variabilità intraserie (n = 8) E' stata valutata la variabilità nel tempo della concentrazione media degli analiti ed inoltre la 'desiderable quality specifications' per la precisione tra serie (n=8) è stata ottenuta confrontando i dati con 1/2 della variabilità biologica tra soggetti (CVb) (\*).

**Risultati:** I dati, a nostra disposizione, hanno evidenziato una perdita della precisione biologicamente non accettabile entro la decima giornata, per i seguenti analiti:

analiti	Media Tempo 0	CV		1/2CVb (* )
		4 – 8 °C	20– 25 °C	
Glucosio	130 mg/dl	3.56	3.95	3.85
Ast	39.2 U/L	2.12	8.98	8.85
Alt	43.6 U/L	3.96	12.5	9.5
Bil tot	0.79 mg/dl	4.78	25	15.25
Fostato	3.3 mg/dl	1.96	10.3	4.7
C 3	115.6 mg/dl	4.07	8	7.8

**Conclusioni:** La variabilità osservata in questi analiti può essere giustificata da fattori biologici (attivazione e/o disattivazione o metabolismo di proteine in vitro) e da fattori chimico/fisici. Questi risultati incoraggiano lo studio della precisione analitica su di un più ampio pannello di analiti utilizzando campioni con valori patologici e dosati con differenti metodologie onde definire le corrette procedure da eseguire in caso di ripetizioni di test su campioni di siero conservati

(\* ) C.Ricos, V.Alvarez et al. Scand. J Clin.Lab Invest 1999;491-500

CHECK-IN: UNO SPRECO DI RISORSE UMANE, O  
UN'EFFICACE STRUMENTO DI CONTROLLO?

Biffi M., Pirovano B., Grossi A., Ramella C., Roncaccia P., Fenili D.

U.O. Medicina di Laboratorio - Ospedali Riuniti di Treviglio

L'errore analitico è oggi ridotto, mentre gli errori pre-analitici e post-analitici condizionano pesantemente l'outcome complessivo dell'esame di laboratorio.

L'80% degli errori riscontrati nei laboratori riconoscono cause di tipo organizzativo più che di tipo analitico. Si tratta di errori legati ad una errata identificazione del paziente, errata specifica del reparto, errata interpretazione dell'esame richiesto dal medico, dimenticanza di uno o più esami nella richiesta, l'uso di contenitori inappropriati, modalità di raccolta poco accurate, modalità di trasporto inadeguate per gli analiti oggetto del dosaggio. E' più che mai necessario quindi standardizzare le procedure pre-analitiche.

Tali necessità hanno trovato nel progetto di certificazione ISO 9002, a cui la nostra Unità Operativa sta aderendo, la giusta incentivazione per ricercare strumenti che potessero, se non completamente, almeno in parte soddisfare tali controlli.

A tale scopo sono state preparate nuove schede ottiche e riviste le modalità di raccolta dei campioni biologici, oltre alla centralizzazione e standardizzazione dei processi di trattamento pre-analitico dei campioni.

In particolare nell'area di raccolta dei campioni biologici conservati, secondo i protocolli, in idonei contenitori anche termostabili e refrigerabili, sono state approntate procedure di verifica delle condizioni preanalitiche indispensabili per garantire l'accuratezza dei risultati, come per esempio la misura del pH urinario, il pretrattamento dei campioni lipemici etc.

La nuova organizzazione integrata nel "check in" dei campioni pervenuti, ci ha consentito di rispondere ad alcuni importanti requisiti della norma quali:

- l'obbligo di un fornitore di soddisfare le richieste del cliente (4.3 riesame del contratto)
- il controllo del prodotto fornito dal cliente (punto 4.7) valutandone l'idoneità rispetto gli standards definiti
- la rintracciabilità del campione (punto 4.8)
- il controllo del campione non conforme (punto 4.13) attraverso la sua identificazione a fronte di un controllo pianificato, la segregazione, la registrazione della non conformità rilevata ed il conseguente trattamento in tempo reale. Inoltre tali registrazioni, raccolte in maniera sistematica, rappresentano un importante indicatore utile nel riesame da parte della direzione.

Il processo di *check-in* per la nostra Unità Operativa ha rappresentato uno strumento faticoso ma di straordinaria efficacia, anche nella condivisione delle norme del Sistema Qualità che rischia di essere visto come un pesante adempimento burocratico.

## CONTROLLO ESTERNO DI QUALITÀ DEI TEMPI D'ATTESA DEGLI ESAMI URGENTI

Coviello M., Italia A., Savino E., Casamassima P., Maci R., Quaranta M.

U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Istituto Oncologico, Bari

### Scopo:

Il "turnaroundtime" (TAT), il tempo che intercorre tra l'accettazione del campione e la consegna del referto, è un indicatore fondamentale dell'accuratezza delle prestazioni eseguite soprattutto in regime d'urgenza.

La nostra U.O. ha partecipato ad un programma di VEQ per i seguenti analiti testati in urgenza: emoglobina (Hb), Tempo di Protrombina (PT), potassio (K<sup>+</sup>). Sono stati considerati, quindi, i rispettivi TAT d'attesa.

### Materiali e metodi:

E' stata registrata l'ora di effettuazione del prelievo e l'ora di arrivo in laboratorio; sono state verificate le non conformità delle richieste e/o dei campioni e queste registrate e comunicate ai rispettivi reparti. E' stata effettuata l'accettazione tramite sistema informatico. Per l'Hb, campioni di sangue intero sono stati raccolti su EDTA K<sub>2</sub>, testati mediante Analizzatore "SISMEX SE 9000. Il PT è stato effettuato su plasma, proveniente da sangue intero citratato, analizzato tramite coagulometro "ELECTRA 1600 C". Il K<sup>+</sup> è stato determinato su campioni di siero analizzati tramite il "912 Automatic Analyzer Hitachi". I risultati sono stati validati, referatati e smistati. Il TAT è stato calcolato nel periodo tra ottobre 1998 e novembre 2000.

### Risultati e discussioni:

Il TAT medio per l'Hb è stato valutato su 895 campioni provenienti da pazienti neoplastici ed è risultato pari a 12', posizionando la nostra U.O. ai primi posti di una graduatoria comprendente 9 laboratori italiani. Inoltre il 90% dei tests erano completati, in media, dopo 19', il 50% dopo 11'; entro 60' erano stati completati, mediamente il 100% dei tests, entro 30' il 96% e entro 15' l'84%. Il TAT per il PT, calcolato su 620 campioni, è stato di 44'; tale valore è in linea con quelli medi degli altri laboratori. Inoltre, il 90% dei tests erano completati, in media, dopo 59', il 50% dopo 42'; entro 60' erano stati portati a termine 91%, entro 30' il 18% e entro 15' l'1.4%. In posizione leggermente arretrata è risultato, invece, il TAT per il K<sup>+</sup> che è stato pari a 74' su 872 campioni. Nella nostra U.O. questo test non è stato effettuato solo su campioni in regime d'urgenza. Quindi il 90% dei test erano completati, in media, dopo 138', il 50% dopo 64'; entro 60' erano stati completati il 53% dei tests, entro 30' il 7.5% ed entro 15' lo 0.6%. Risulta, dunque, evidente l'importanza di un Sistema di Controllo di Qualità per migliorare la precisione e l'accuratezza delle prestazioni di laboratorio.

### Riferimento bibliografico:

Valenstein-PN; Emancipator-K/ Am-J-Clin-Pathol. 1989 Apr; 91 (4);452-7. Sensitivity, specificity and reproducibility of four measures of laboratory turnaroundtime.

## ANALYTICAL GOALS USED IN EQA SCHEMES OF THE CENTRE OF BIOMEDICAL RESEARCH FOR QUANTITIES ASSAYED IN SERUM

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

Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV) Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

The Centre of Biomedical Research (CRB) has managed EQAS since 1985 and its role is to identify participants with problems, to notify laboratories if their performance is unacceptable and to offer help and advice. Criteria for defining performance for individual laboratory results as "acceptable" or "unacceptable" are extremely important: the number of laboratories with a "poor performance" depends entirely upon acceptability criteria used.

In our scheme acceptability limits are based on biological variation but we have replaced the too stringent and the too loose Fraser's limits with ones, that are their multiple or under-multiple, derived from the processed Fraser's formula.

At the beginning of a new EQA cycle we verify the appropriateness of these limits and eventually modify some of them in view of the percentages of results with a total error within the acceptability limits achieved in previous EQA cycles (state-of-the-art). New limits are selected so that no more than 25% of the laboratories results to have an unacceptable performance.

In the Table are reported the limits used for some proteins in three consecutive cycles. For example when the Fraser's optimum limit becomes the desirable limit for CRB, the CRB's acceptability limit for IgA is 10.3.

PROTEIN	ACCEPTABILITY LIMIT			
	Fraser	CRB		
		1999	2000	2001
Albumin	5.4	D → O 10.8	D → O 10.8	A → D 8.13
a <sub>1</sub> -acid glycoprot.	22.6	A 22.6	D → A 15.1	O → D 11.3
IgA	20.6	D → A 13.7	D → A 13.7	O → D 10.3
IgM	25.4	A 25.4	D → A 16.9	O → D 12.7
C4	23.1	A 23.1	D → A 15.4	O → D 11.6

O = optimum; D = desirable; A = acceptable.

The data demonstrate a reduction of acceptability limits in the time accordingly to an improvement in analytical quality. Our dynamic analytical goals encourage laboratories to continuously improve their analytical performances and avoid to discourage them with limits hardly attainable.

- Ann Clin Biochem 1997;34:8-12

- Clin Chem Lab Med 1999;37;Supplement:S295.

Hb BARI ( $\alpha$  45 HIS $\rightarrow$ GLN) ASSOCIATA AD ALFA TALASSEMIA: NUOVE OSSERVAZIONI IN DUE FAMIGLIE DEL SUD ITALIA

Mangione M<sup>1</sup>, Ivaldi G.<sup>2</sup>, Leone D.<sup>2</sup>, Parodi M.I.<sup>2</sup>, Collell M.<sup>1</sup>, Sanseverino P.<sup>1</sup>, Scimè-Degani V.<sup>1</sup>

(1)Laboratorio Patologia Clinica O.I.R.M.-S.Anna TO;  
(2)Laboratorio di Genetica Umana-Microcitemia, Ospedali Galliera, GE;

Nel 1980 Marinucci et al. (1) descrissero il primo e unico caso di Hb Bari in una famiglia pugliese; a distanza di 20 anni tale variante è stata osservata in altre due famiglie, una pugliese (Fam.1) e una calabrese (Fam.2) non imparentate con la prima; in alcuni membri di entrambe le famiglie l'Hb Bari è risultata associata ad un trait  $\alpha$  talassemico.

A causa di una discreta microcitosi, riscontrata in precedenza a sideremia normale, in alcuni membri delle due famiglie sono stati eseguiti i test specifici per la ricerca di eventuali difetti talassemici; la separazione dell'Hb in HPLC Variant (Bio-Rad) mostrava una emoglobina anomala che veniva separata dopo l'Hb A, in quantità variabile nei diversi soggetti (da 12.0 a 22.1%) mentre l'elettroforesi a pH alcalino risultava normale; i test di stabilità dell'Hb erano negativi. La successiva analisi delle catene globiniche metteva in evidenza la presenza di catene  $\alpha$  anomale che successivamente venivano studiate mediante digestione triptica e analisi degli aminoacidi del peptide 6 (Tp6, 41-56) separato in posizione leggermente più idrofila rispetto al normale Tp6. Si poteva così precisare che la variante delle catene  $\alpha$  osservata corrispondeva all'Hb Bari ( $\alpha$  45 His $\rightarrow$ Gln). Si è quindi proceduto all'analisi molecolare dei geni  $\alpha$  globinici per la ricerca di eventuali difetti  $\alpha$  talassemici associati nei soggetti che presentavano microcitosi e percentuali di Hb mutata significativamente più elevate. L'esito di tali indagini è risultato positivo per la delezione 3.7 Kb che era presente allo stato eterozigote in un soggetto della Fam.1 e in due della Fam. 2.

Le nostre osservazioni confermano che l'Hb Bari rappresenta una variante "innocente" delle catene  $\alpha$  globiniche anche quando si presenta associata a difetti  $\alpha$  talassemici. Va quindi ribadito il concetto della opportuna caratterizzazione dei diversi difetti globinici, talassemici e strutturali soprattutto se associati, al fine di poter disporre delle informazioni utili per una corretta valutazione di eventuali rischi genetici.

1. Marinucci M. et al. *Biochim.Biophys.Acta* 622: 315-319, 1980.

RETICOCITI E GRAVIDANZA FIOLOGICA

Mazzone R., Collell M., Crepaldi E., Mancini G.

Azienda Ospedaliera OIRM S.Anna Laboratorio Analisi Chimico Cliniche C.so Spezia 60 – 10126 Torino

Lo stato di gravidanza, anche fisiologica, comporta modificazioni di numerosi parametri ematochimici, con variazioni dei valori di riferimento rispetto alla situazione non gravidica. A livello midollare la stimolazione ormonale estrogenica e dell'eritropoietina provoca un'iperplasia eritroide con un aumento della massa dei globuli rossi di circa il 18%, mentre l'aumento del volume plasmatico a livello periferico produce il caratteristico "effetto di emodiluizione": pertanto il numero dei globuli rossi, l'ematocrito e l'emoglobina riducono i loro valori mediani nel corso dell'età gestazionale: "pseudoanemia fisiologica della gravidanza" (Tab. 1)

SCOPO del presente lavoro è stato valutare in gestanti dal I al III trimestre le modificazioni osservabili nel conteggio dei reticolociti circolanti, indici sensibili di efficace ematopoiesi midollare.

PAZIENTI E METODI

Abbiamo reclutato 92 gravide fisiologiche, di età compresa fra i 24 ed i 42 anni, 32 del I trimestre (fino alla 13° sett.), 24 del II (dalla 13° alla 26°) e 36 del III (dalla 26° alla 39°). L'esame emocromocitometrico è stato eseguito sul contaglobuli SE 9000 (Dasit) e la conta reticolocitaria è stata effettuata sullo strumento R 3000 (Dasit), con metodo della citofluorimetria a flusso con colorante specifico fluorescente (Auramina O) per fornire le tre frazioni maturative reticolocitarie: LFR, MFR, HFR, a bassa, media, alta fluorescenza.

Trimestre	RBC x 10 <sup>6</sup> / $\mu$ l	Hb g/dl	HCT %	MCV fl
I trim.	4.43	13.1	38.8	80.8
II trim.	4.13	12.4	36.5	90.3
III trim.	3.87	11.7	35.2	92.5

Trimestre	RET %	RET x 10 <sup>6</sup> $\mu$ l	LFR %	MFR %	HFR %
I trim.	12.95	0.06	88.75	10.40	0.90
II trim.	18.90	0.08	82.55	15.20	1.90
III trim.	17.25	0.07	77.40	19.15	3.00

Tabella n° 1: valori espressi in mediana

RISULTATI E CONCLUSIONI

Come illustra la tabella, il conteggio dei reticolociti dimostra un incremento nella componente % e nel valore assoluto ( $p < 0.001$ ). L'incremento del totale è da riferirsi soprattutto all'aumento della frazione ad alta fluorescenza, che identifica una popolazione cellulare più immatura e con maggior contenuto in RNA, che più correla con una spiccata attività eritropoietica midollare.

BIBLIOGRAFIA

- 1) B. H. Davis "Immature reticulocyte fraction (IRF): a useful clinical parameter of erythropoietic activity" 1996 *Laboratory Hematology* 2:2-8

## IL LABORATORIO DI 1° LIVELLO NELLA DIAGNOSI DELLE EMOGLOBINOPATIE: PROPOSTA DI PROTOCOLLO DIAGNOSTICO

Gruppo di lavoro SIBioC Piemonte: Scimè Degani V.<sup>1</sup>, Mangione M.<sup>1</sup>, Collell M.<sup>1</sup>, Musso M.<sup>2</sup>, Paparo C.<sup>3</sup>, Amprimo M.C.<sup>4</sup>, Priarone A.<sup>5</sup>, Mazzarello M.G.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Osp. OIRM-S. Anna, <sup>2</sup> Osp. Sta. Croce Cuneo, <sup>3</sup> Osp. Chieri, <sup>4</sup> Osp. G. Bosco Torino, <sup>5</sup> Osp. Ovada

**Premesse e scopi:** le attuali restrizioni della spesa sanitaria, inducono a considerare una razionalizzazione della spesa con la proposta di percorsi diagnostici essenziali per la diagnostica di Laboratorio (Legge 662 del 23/12/1996). Il Piano Sanitario Nazionale per il triennio 1998-2000 suggerisce l'adozione di "linee guida" per l'utilizzo di prestazioni a favore dei soggetti che maggiormente ne possono trarre beneficio (1). Tenendo conto di questi suggerimenti la SIBioC Piemontese ha formato un gruppo di lavoro che si è posto i seguenti obiettivi: individuare le linee guida da proporre alla Regione Piemonte per la diagnostica di laboratorio di 1° livello delle Emoglobinopatie. Prendendo spunto dalla Circolare emessa nel 1994 dalla Regione Sicilia, ci siamo proposti di studiare non solo l'iter diagnostico ma anche le metodologie accreditate da utilizzare. Emerge, infatti, l'esigenza di trovare sistemi standardizzati, poco costosi e alla portata di tutti i laboratori, con controlli quali-quantitativi in grado di fornire indicazioni utili ad orientare e razionalizzare successive indagini di 2° livello.

La prima fase del lavoro è stata realizzata con l'invio ai laboratori piemontesi di un questionario mirato a conoscere il tipo d'esami e le metodologie utilizzate per la diagnostica delle Emoglobinopatie.

**Risultati:** I laboratori che hanno risposto sono stati 32 su 35 (91%). Il 97 % esegue sempre l'emocromo, il 68% la sideremia, il 57 % la transferrina, e il 56 % la ferritina. Tutti dosano sempre l'HbA2 ed il 97 % dosa anche l'HbF. Il 78 % utilizza metodiche HPLC, il 22 % cromatografia a scambio ionico su colonna ed elettroforesi. L'81% utilizza calibratori e controlli. Il 59% esegue CQ interno con controllo statistico.

**Conclusioni:** gli esami proposti per un corretto iter diagnostico sono: esame emocromocitometrico, sideremia, transferrina, saturazione della transferrina, dosaggio di emoglobina A<sub>2</sub>, dell'emoglobina fetale e analisi quali-quantitativa delle varianti emoglobiniche. I metodi migliori sembrano essere i sistemi HPLC perché sono più facilmente automatizzabili, standardizzabili e di conseguenza permettono di tenere sotto controllo statistico il CQ interno dei parametri dosati; inoltre i valori di riferimento sono più omogenei consentendo una buona trasferibilità dei risultati. La seconda fase del lavoro che ha come scopo la discussione della proposta con i clinici sarà ultimata il prossimo anno.

**Bibliografia:** (1) D. M. 10/9/98, sui "Protocolli di accesso agli esami di laboratorio per le donne in stato di gravidanza"

## QUALITÀ DEGLI STRISCI DI SANGUE PERIFERICO ESEGUITI MEDIANTE SISTEMA COULTER GEN-S SLIDE MAKER

Campioli D., Ottomano A.M., Bergonzini G.

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

**Obiettivo:**

Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione della qualità degli strisci di sangue periferico eseguiti mediante sistema automatizzato COULTER GEN-S SLIDE MAKER. Riteniamo infatti molto interessante la disponibilità di sistemi automatizzati per l'esecuzione e la colorazione degli strisci di sangue periferico che abbinati al contaglobuli e ad un sistema gestionale informatizzato consentano la completa automazione dell'analisi ematologica.

**Materiali e metodi:**

Abbiamo valutato l'effetto della diffusione degli elementi figurati del sangue periferico sul vetrino confrontando i conteggi leucocitari differenziali eseguiti al microscopio ottico da 2 operatori che hanno contato 200 cellule ciascuno su 10 strisci dello stesso campione eseguiti dal sistema Slide Maker e su 10 strisci eseguiti manualmente da 10 operatori diversi, sempre dello stesso campione. Abbiamo inoltre valutato la differente distribuzione delle cellule sul vetrino confrontando i conteggi ottenuti da 4 operatori per 100 cellule ciascuno su due zone differenti del vetrino: zona centrale e zona marginale.

**Risultati:**

I CV delle diverse serie sono bassi per le popolazioni più rappresentate, senza differenze significative tra strisci manuali ed automatici:

	Ne	Li	Mo	Eo	Ba
Manual	2.7	4.6	22.9	26.4	48.2
SM	4.3	6.2	12.6	25.5	39.1

I CV risultano più alti per gli elementi meno rappresentati e sempre vantaggiosi per i preparati automatizzati. Inferiori sono risultate inoltre le differenze di distribuzione degli elementi tra la zona marginale e la zona centrale nello striscio automatico rispetto allo striscio manuale:

	Ne	Li	Mo	Eo
Manual	9.1	-22.9	68	58
SM	-0.5	-4.6	14.9	18.2

**Conclusioni:**

Il sistema consente di ottenere i vantaggi attesi dalla automazione in termini di standardizzazione, sicurezza, e risparmio di tempo garantendo preparati di buona qualità.

**Bibliografia:**

Benattar L and Flandrin G. Comparison of classical manual pushed wedge films, with an improved automated method for making blood smears. *Hemat. and Cell Ther.* 1999;41:211-215.

### Hb MOLFETTA [ $\beta$ 126 (VAL $\rightarrow$ LEU)]: UNA NUOVA VARIANTE "SILENTE" DELL'EMOGLOBINA IN UNA FAMIGLIA PUGLIESE

Ivaldi G., Baffico M., Baldi M., Leone D., Parodi M.I., Pietrapertosa A.<sup>1</sup>, Campanale D.<sup>1</sup>, Tannoia N.<sup>1</sup>

Laboratorio di Genetica Umana-Microcitemia, Ospedali Galliera, Via A.Volta 10, 16128 Genova; (1) Cattedra di Ematologia II, Università di Bari, BA.

A tutt'oggi sono state descritte circa 800 diverse varianti dell'emoglobina (Hb). Storicamente l'avventura delle emoglobinopatie è iniziata con l'identificazione dell'Hb S, come difetto molecolare, negli anni '50, successivamente sono stati descritti altri difetti strutturali dell'Hb soprattutto con proprietà elettroforetiche diverse dall'Hb A. Altre emoglobinopatie sono state riscontrate in soggetti con anemia emolitica o policitemia. Con il diffondersi dei metodi cromatografici per il monitoraggio del diabete mellito una nuova serie di varianti si sono potute osservare in quanto interferenti nelle separazioni cromatografiche a scambio ionico. Recentemente il diffondersi di metodi "dedicati" in HPLC per la separazione delle catene globiniche hanno consentito di poter osservare ancora nuove varianti, "silenti" agli altri metodi analitici, che mostravano soltanto differenti gradi di idrofobicità.

Recentemente abbiamo potuto esaminare una donna gravida, con il marito portatore di trait  $\beta$  talassemico (IVSII-1), che presentava valori emocromo-citometrici normali, separazioni elettroforetica e HPLC normali, ma l'Hb A<sub>2</sub> era ai limiti superiori della norma (3.1-3.4%, v.n. inferiori a 3.2%). Negativa risultava la ricerca molecolare di difetti  $\beta$  talassemici ma, eseguita la biosintesi *in vitro* delle catene globiniche, la separazione cromatografica mostrava la presenza di  $\beta$  catene anomale (45.2%) più idrofobiche delle catene  $\beta$  normali. I test di stabilità dell'Hb erano negativi e lo studio del DNA mediante analisi della sequenza nucleotidica del gene  $\beta$  indicava la presenza di una mutazione G $\rightarrow$ C nt 1409 corrispondente alla sostituzione Val $\rightarrow$ Leu al codone 126 delle catene  $\beta$  globiniche. Tale variante emoglobinica "silente", mai descritta in precedenza, è stata denominata Hb Molfetta dal paese in cui vive la paziente esaminata. Il codone 126 che porta la sostituzione non rappresenta una posizione particolarmente rilevante per i contatti con l'eme e i legami tra catene, per cui da un punto di vista funzionale dovrebbe risultare normale. Si può quindi concludere che l'Hb Molfetta allo stato eterozigote rappresenti una condizione "silente" anche da un punto di vista clinico; ulteriori indagini sull'affinità per l'O<sub>2</sub> o nuovi riscontri, anche in associazione con trait talassemici, potranno meglio precisare e caratterizzare i comportamenti *in vivo*.

Huisman T.H.J. et al. : *A Syllabus of Human Hemoglobin Variants* 2th Ed. S.C.A.F., Augusta, GA, USA, 1998.

### IDENTIFICAZIONE PRELIMINARE DELLE VARIANTI EMOGLOBINICHE MEDIANTE HPLC "DEDICATO": AGGIORNAMENTI

Ivaldi G., Leone D., Parodi M.I., Pascotto D., Scimè-Degani V.<sup>1</sup>, Mangione M.<sup>1</sup>, Mercadanti M.<sup>2</sup>, Fortini P.<sup>3</sup>

Laboratorio di Genetica Umana-Microcitemia, Ospedali Galliera, Via A.Volta 10, 16128 Genova; (1) Lab.Patol. Clinica O.I.R.M.-S.Anna, Torino; (2) Lab. Analisi Az. Osp., Parma; (3) Lab. Analisi Ist. G.Gaslini, Genova.

Poter interpretare un assetto emoglobinico (Hb) anomalo contenente una variante Hb, eventualmente anche associata ad altri difetti talassemici e poter quindi identificare la variante mediante un semplice metodo analitico, è sempre stato motivo di vivo interesse fra gli addetti ai lavori. Nel corso degli anni sono state compilate tabelle e liste con indici caratteristici e identificativi di molte varianti Hb partendo dalla loro diversa mobilità elettroforetica espressa a pH basico, acido o in isoelettrofocalizzazione. Successivamente, l'uso prevalente di tecniche cromatografiche, in particolare l' HPLC, ha fornito nuove opportunità per disporre di altri riferimenti e nuovi indici interpretativi (1).

In anni recenti utilizzando come primo approccio per la valutazione quali-quantitativa delle componenti normali o patologiche dell'Hb un sistema "dedicato" in HPLC (Variant<sup>TM</sup>, Bio Rad), abbiamo analizzato oltre 300 soggetti portatori di una o più varianti Hb. Sono state individuate e caratterizzate 61 diverse mutazioni Hb e ricavato un parametro caratteristico per ciascuna di esse, definito da un numero (p.i.p., parametro identificativo preliminare) dato dal rapporto tra il tempo di eluizione della variante e quello dell'Hb A. L'elenco ottenuto vede in testa il valore 0.05 dell'Hb Bart's e termina con il 2.15 dell'Hb C. Si possono anche riconoscere gruppi di varianti Hb con valori simili tra loro compresi tra 0.5 dell'Hb F, 1 dell'Hb A e 1.5 dell'Hb A<sub>2</sub>. Alcune rare emoglobinopatie sono state osservate in soggetti isolati altre in più pazienti; sono state ripetute più determinazioni per ogni campione a distanza di pochi giorni e a diversa concentrazione.

I parametri tabellati rappresentano i valori medi, sufficientemente indicativi di ogni singola variante: la loro riproducibilità è legata al sistema HPLC utilizzato e alla buona conservazione dei campioni. L'intervallo fiduciale calcolato per ogni valore è risultato  $\pm 0.05$ ;

Si può ritenere che queste informazioni di 1° livello possano fornire, per alcune varianti (Hb, Hb S, Hb D Los Angeles o D Punjab, Hb C, Hb G St. Josè, Hb Gambara) indicazioni anche definitive, ma soprattutto possano essere utili per orientare le successive fasi della caratterizzazione molecolare e/o funzionale.

1. T.H.J. Huisman, *Hemoglobin* 22: 267-272, 1998.

## DETERMINAZIONE DI HbA1c (STABILE, LABILE): DUE STRUMENTI A CONFRONTO

Mangione M., Collell M., Sanseverino P., Palisi A., Murtas R., Scimè-Degani V.

Dip. Patologia Clinica. Laboratorio Analisi. AO Materno-Infantile OIRM-S. Anna, Torino

L'emoglobina glicata (HbA1c) rappresenta il marcatore più importante per il controllo del metabolismo glucidico nei pazienti diabetici. Essa può essere considerata indice dell'efficacia del controllo del diabete in quanto correlata al valore medio della glicemia nei 2-3 mesi precedenti la sua determinazione (1).

Scopo dello studio è stato quello di:

1- Valutare le caratteristiche del metodo cromatografico del sistema HPLC-Variant II (BIO-RAD) per la determinazione dell'emoglobina glicata stabile e labile, calcolandone la precisione nella serie e tra le serie, la linearità ed il recupero.

2- Correlare i dati ottenuti con quelli dello strumento HPLC L-9100 (Merck-Hitachi).

Materiali e metodi: Sono stati raccolti 200 campioni di sangue intero da pazienti ambulatoriali od ospedalizzati, indipendentemente dallo stato di salute-malattia, ma selezionati in modo da coprire l'intervallo dei valori abitualmente misurati (normali, alti e bassi). Per i valori di riferimento sono stati considerati 150 campioni da soggetti apparentemente sani e con livelli di glicemia nella norma.

Risultati: Lo strumento Variant II si è dimostrato preciso sia per i risultati dei dosaggi inter-serie (CV%= 3.39 per i valori bassi e 1.49 per i valori alti) sia per quelli dei dosaggi intra-serie (CV% = 1.84 per i valori normali e 0.72 per quelli patologici). Il test del recupero (R=0.986) e la linearità sono risultati soddisfacenti. Altrettanto buona è stata la correlazione tra le determinazioni dell'analita (R=0.99 per la stabile e R=0.96 per la labile) nei due strumenti considerati.

Conclusioni: Alla luce delle prove effettuate e dei dati elaborati, si può concludere che i due sistemi in esame, hanno simile valenza ai fini del monitoraggio del compenso metabolico nel paziente diabetico. I valori delle HbA1c ottenuti sui due strumenti sono ben correlati, anche se quelli ottenuti sul L-9100 sono inferiori in media di 0,4 unità rispetto a quelli ottenuti con il Variant II. Questa differenza probabilmente deriva da un errore di integrazione durante la calibrazione dello strumento L-9100 che non è in grado di separare sul calibratore l'HbA1c labile dalla stabile. Lo strumento Variant II evidenzia con particolari allarmi la presenza di varianti emoglobiniche quali la HbS, HbC, HbD, ecc., e provvede al calcolo corretto dell'HbA1c stabile.

Bibliografia : (1) Mayer TK, Zachary RF. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. Clin. Chim. Acta 127, 147-184, 1983.

## DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI RETICOCITARI IN PRIMA GIORNATA DI VITA

David O., Mazzone R., Garbarini S.\*, Defacis D., Biolcati A., Mastretta E.°, Collell M., Leone L.

Laboratorio Patologia Clinica O.I.R.M.; \*Cattedra di Neonatologia- Università di Torino; °Neonatologia-Ospedale S. Anna; Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S. Anna, Torino.

Premesse e scopi. Precedenti studi avevano riportato i valori di riferimento dei parametri reticolocitari, ottenuti in citometria a flusso, su soggetti in età pediatrica ed adulti. Scopo del ns lavoro è stato quello di misurare gli indici reticolocitari in un gruppo di neonati fisiologici a termine in prima giornata di vita.

Casistica e metodica. Sono stati esaminati 30 neonati fisiologici a termine, normopeso in prima giornata di vita, con anamnesi familiare negativa per patologie ematologiche. Sono stati esclusi dallo studio neonati con patologie d'organo o distress respiratori.

L'esame emocromocitometrico e i parametri reticolocitari sono stati determinati su contaglobuli ADVIA 120 (Technicon-Bayer).

Risultati. Come illustrato in Tabella 1, il numero di reticolociti totali (r) la frazione ad alto contenuto di RNA (H-Ret) erano aumentati, rispetto ai valori riscontrati nella popolazione adulta (1,2). Il rapporto CHCMr/CHCMm <1 conferma come anche nel neonato sia presente una diminuita concentrazione dell'Hb reticolocitaria rispetto a quella dei globuli rossi (m). Il rapporto CHr / CHm ~ 1 indica una costante sintesi emoglobinica a livello midollare (1). Il significativo aumento dell'RDWm (RDWr / RDWm = 0.82±0.5, p<0.0001) e il rapporto MCVr / MCVm = 1.17, modestamente ridotto rispetto i valori da altri autori nelle successive età della vita, riflettono le variazioni dell'eritropoiesi prenatale (2). Il rapporto Hbm/Hbr superiore a quello riportato nei soggetti adulti concorda con la ridotta vita dei globuli rossi in epoca neonatale (3).

Tabella 1

	m	DS		M	DS
Ret x 10 <sup>9</sup> /L	232.7	66.06	RDWr %	12.59	2.0
H-Ret %	11.77	6.46	RDWr/RDWm	0.82	0.5
MCVr fL	120.94	7.04	MCVr/MCVm	1.17	0.05
CHCMr %	29.43	1.27	CHCMr/CHCMm	0.84	0.02
CHr pg	35.35	1.64	CHr/CHm	0.99	0.03
Hbr g/L	8.25	2.49	Hbm/Hbr	24.62	10.08

Conclusioni. Questi preliminari risultati indicano come la messa a punto di valori di riferimento degli indici reticolocitari possa essere di utilità per la diagnosi delle patologie ematologiche in epoca neonatale.

### Bibliografia

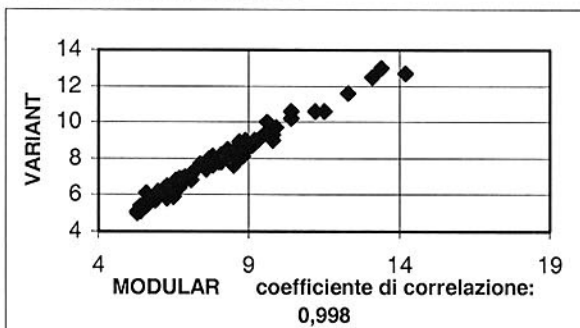
- 1) Buttarello et al. Arch pathol Lab Med 1995; 119: 1141
- 2) D'Onofrio et al. Blood 1995; 85:818
- 3) Brugnara C. Crit Rev Clin Lab Sci 2000; 37:93

## EMOGLOBINA GLICATA ED HPLC

Rossi L., Lucchetti A., \*Giampietro O., \*Matteucci E,  
\*Fagnani F., \*Mariani S., Innocenti B.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e  
Microbiologiche I, Azienda Ospedaliera Pisana  
\*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

Il diabete mellito è una malattia cronica caratterizzata dall'iperglicemia e accompagnata da disturbi nel metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine. Danni a lungo termine come retinopatia, neuropatia, nefropatia e malattie cardiovascolari possono essere limitati da un controllo efficace del livello di glucosio ematico. Le raccomandazioni dell'ADA (American Diabetes Association) confermano il ruolo estremamente importante dell'HbA1c nel monitoraggio dei pazienti diabetici, sia di tipo 1 che di tipo 2. Scopo del nostro lavoro era valutare il nuovo strumento Variant II (Biorad), un'analizzatore completamente automatico per la determinazione qualitativa e quantitativa delle frazioni emoglobiniche e varianti mediante tecnica HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione). Sono stati analizzati 100 campioni di sangue intero (con anticoagulante EDTA) provenienti dall'ambulatorio per le malattie metaboliche e del ricambio del nostro presidio. La metodica di uso quotidiano consiste in un test immunologico turbidimetrico di inibizione (Tina-quant, Modular, Roche Diagnostics) che prevede solo l'emolisi manuale del campione ematico (1 minuto) prima della procedura analitica (completamente automatica), con un tempo di analisi di circa 16 minuti (incluse le fasi di avvio dell'analizzatore). Il Variant II esegue un campionamento diretto da tubo primario con identificazione da barcode, caricamento in continuo delle provette ed emolisi on-board, a differenza della versione precedente (Diamat) che richiedeva una preincubazione dei campioni emolisi di 30 minuti a 37 °C; il suo ciclo analitico completo è di 3 minuti. Per entrambe le metodiche sono stati utilizzati i controlli forniti dalle ditte produttrici.



Entrambi le metodiche risultano ottimali nella gestione ambulatoriale dei livelli di emoglobina glicata del paziente diabetico. La nuova metodica HPLC, grazie soprattutto all'emolisi automatica, alla facilità di utilizzo e alla riduzione dei tempi di refertazione, ha permesso l'inserimento della cromatografia, una tecnica complessa ed indagativa, nell'uso routinario di ogni laboratorio di analisi.

CONTA AUTOMATIZZATA DEI RETICOLOCITI:  
CONFRONTO TRA METODI

Trainini L., Tommasi M.\*, Ascari E., Caimi L.

Laboratorio Analisi Spedali Civili-Brescia  
\*Abbott SpA Div. Diagnostics

**Introduzione** La conta dei reticolociti è il test più valido per monitorare l'attività eritropoietica del midollo osseo. Grazie all'introduzione di metodi automatizzati è stato possibile raggiungere una rapidità, una precisione ed un'accuratezza notevoli rispetto alla conta manuale, ormai utilizzata solo come metodo di riferimento. Esiste, però, una certa disomogeneità tra le varie metodiche presenti sugli strumenti, suddivise in due categorie principali (metodo in fluorescenza e metodo ottico), che può causare delle differenze nella conta. Inoltre, i diversi algoritmi per l'analisi della popolazione immatura dei reticolociti costituiscono un problema rilevante nella standardizzazione di questo parametro, poco utilizzato a causa di questa limitazione. Scopo del nostro lavoro è stato il confronto tra due metodi differenti per valutarne le prestazioni, sia a livello di conta sia di sottopopolazioni reticolocitarie.

**Materiali e metodi** Abbiamo analizzato 62 campioni raccolti in K2-EDTA con l'analizzatore Abbott Cell Dyn 4000 (Arancio di tiazolo modificato CD4K530 e argon laser) e Bayer Advia 120 (Oxazina 750 e diodo laser) e per ogni campione è stata eseguita la lettura al microscopio ottico, secondo il protocollo in uso (nuovo blu di metilene e lettura su 1000 globuli rossi). Inoltre, abbiamo confrontato le popolazioni reticolocitarie immature fornite dai due strumenti, correlando la IRF (Immature Reticulocyte Fraction) del Cell Dyn con quella dell'Advia, calcolata come somma della frazione a media assorbanza (M retics) e di quella ad alta assorbanza (H retics) dei reticolociti.

**Risultati e Conclusioni** Il confronto tra Cell Dyn 4000 (preso come riferimento nella determinazione dei valori di conta), Advia 120 e metodo manuale ha mostrato nel range di reticolociti tra 0 e 10% una ottima concordanza (92% vs Advia e 94% vs microscopio), sebbene abbiamo trovato qualche bias tra metodi a differenti livelli di conta. Infatti, per un livello compreso tra 0-1% di reticolociti (17 campioni), la concordanza è stata 86% vs Advia e 72% vs il microscopio, per il livello tra 1-2% (27 campioni) è stata rispettivamente 41% e 60%, per il livello oltre 2% (18 campioni) è stata 87% e 90%. Inoltre, soprattutto nei livelli più bassi, abbiamo riscontrato una netta sovrastima di Advia verso Cell Dyn 4000 e di quest'ultimo verso il microscopio, mentre per le conte tra 1-2% abbiamo notato l'estrema dispersione dei risultati intorno alla linea di identità tra Cell Dyn e gli altri due metodi. Riguardo alla correlazione tra IRF, la concordanza si è rivelata scarsa (69%), a causa dei differenti algoritmi utilizzati dai due analizzatori per il calcolo di questo parametro.

In conclusione, il Cell Dyn 4000 ha mostrato ottime performance anche in presenza di livelli bassi di reticolociti.

## VALUTAZIONE DELLA VARIABILITÀ DEI PARAMETRI RETICOLOCITARI E BIOUMORALI DI ERITROPOIESI

Mileti A., Lovero R., Cleopazzo E., Chiarella A., Pansini N.

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

La diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con anemia si avvale di parametri eritrocitari (Hb, Hct, RBC, MCV, RDW, Reticolociti) e di parametri biochimici (sideremia, transferrina, ferritina, eritropoietina (EPO), recettore solubile della transferrina (sTfR). Il dosaggio di questi parametri fornisce un'ottima valutazione dell'attività eritropoietica midollare.

**Scopo del lavoro:** è stato quello di valutare la sensibilità e variabilità dei parametri reticolocitari e bioumorali (EPO, Ferritina, sTfR) in soggetti normali e sideropenici al fine di poter individuare un razionale utilizzo integrato degli stessi nella clinica.

**Materiali e metodi:** Sono stati analizzati n° 28 campioni di soggetti sideropenici non trattati afferenti al nostro ambulatorio. n° 12 campioni presentavano Hb inferiore a 8 g/dl mentre n° 16 campioni presentavano Hb compresi tra 8 – 9 g/dl I parametri reticolocitari sono stati valutati con gli analizzatori:

- 1) Sysmex SE – 9000: utilizza il principio della citometria a flusso con laser ad argon e come colorante fluorescente per l'RNA reticolocitario l'Auramina O.
- 2) Coulter GEN\*S: utilizza la citometria a flusso con un reagente preformato contenente il nuovo blu di metilene come colorante per l'RNA.

I parametri biochimici EPO, sTfR ferritina: sono stati analizzati in chemiluminescenza (LIAISON - Byk Goulden; CENTAUR - Chiron Diagnostics). Abbiamo valutato la variabilità dei parametri studiati mediante il calcolo del CV e per l'analisi statistica abbiamo utilizzato il t-test per il confronto delle medie.

**Risultati:** Nei pazienti con Hb < 8 g/dl: ferritina cv 78.69; sTfR cv 25.26; EPO cv 69.36 Nei pazienti con Hb (8 - 9 g/dl): ferritina cv 65.26; sTfR cv 17.91; EPO cv 26.96. t - test per il confronto di medie: ferritina p = 0.506; sTfR p = 0.0373; EPO p = 0.005

Parametri reticolocitari SE – 9000 (pz Hb < 8 g/dl): Ret. % cv 35.58; HFR% cv 47.82; MFR% cv 27.31; pz Hb (8 – 9 g/dl): Ret. % cv 39.95; HFR% cv 47.01; MFR% cv 31.11. t – test : Ret. % p = 0.56; HFR% p = 0.01; MFR% p = 0.23

Parametri reticolocitari GENS (pz Hb < 8 g/dl): Ret. % cv 28.11 ; IRF cv 19.38. pz Hb (8 – 9 g/dl): Ret. % cv 32.36 IRF cv 21.33. t - test Ret. % p = 0.20 IRF p = 0.28

**Conclusioni:** In assenza di condizioni di iperplasia eritroide l'aumento del sTfR può fornire un ulteriore valido ausilio diagnostico per la diagnosi di sideropenia ed in particolare per la differenziazione di questa condizione dalla anemia da "malattie croniche". Ulteriori studi dovranno confermare un suo ruolo primario e/o complementare nei differenti tipi e gradi di disordini eritropoietici.

## ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN HEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION (HSCT)

Bamonti F.<sup>1</sup>, Novembrino C.<sup>1</sup>, Cighetti G.<sup>2</sup>, Annaloro C.<sup>1</sup>, Luchesini C.<sup>1</sup>, De Franceschi M.<sup>1</sup>, Bortone L.<sup>2</sup>, Della Volpe A.<sup>1</sup>, Ippolito S.<sup>1</sup>, Lambertenghi Delilieri G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze Mediche, Univ. degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore-IRCCS, Via Sforza 35, 20122 Milano; <sup>2</sup>Dip. Chimica Medica e Biochimica, Univ. degli Studi di Milano, Via Saldini 50, 20133 Milano

HSCT recipients are at risk of an array of vascular complications including hepatic veno-occlusive disease, thrombotic-thrombocytopenic purpura and graft-vs-host disease. Multiple infections, toxic and immunological events are involved in the pathogenesis of such complications. Oxidative stress, defined as an unbalance between pro-oxidant (reactive oxygen metabolites, ROMs) / antioxidant system, may be a common biochemical pathway leading to the development of vascular damage.

Aim of this study was to investigate the possible involvement of the oxidative stress in HSCT by measurements of ROMs, antioxidant system (TAS) and, as rate of oxidant-induced damage, malondialdehyde (MDA) levels. Moreover, the homocysteine ( Hcy) levels were assessed.

Plasma samples were obtained from 12 HSCT recipients (7M/5F, aged 24-53 yrs, mean 40.5±9.1) at two different times (i.e. at start of a transplant conditioning regimen and 2 weeks after HSCT). ROMs and TAS levels were measured by spectrophotometric determinations using the dROMs test (Diacron) and the Randox kit, respectively. MDA (total and free, tMDA and fMDA) levels were simultaneously detected using selected ion monitoring gaschromatography-mass spectrometry in electron impact mode technique. Hcy levels were measured by the IMx immunoenzymatic method (Abbott). Statistical analysis was performed using the Wilcoxon's test.

At 2 weeks after HSCT trends toward an increase of ROMs levels (313±42 vs 391±88 UCarr) and a decrease of TAS levels (2.1±0.4 vs 1.3±0.3 nmol/L) were observed in all the study patients. A consensual fMDA level increase (3.3±2.5 vs 7.8±5.4 µmol/L) was shown whereas tMDA levels did not differ from baseline values (8.2±0.7 vs 7.9±1.5 µmol/L). Hcy basal levels were within the reference interval and did not seem to be affected by HSCT procedure.

Our preliminary data show the presence of an oxidative stress in HSCT recipients. Moreover, the high levels of fMDA indicate that the oxidative damage is still present at 2 weeks after HSCT. These findings could help in early recognizing the development of vascular events and in designing appropriate plans of therapeutical intervention. Lambertenghi Delilieri G., Annaloro C., Lambertenghi Delilieri D. Complications of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologia*, 30: 253-262 (2000).

## OXIDATIVE STRESS IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES

Ippolito S.<sup>1</sup>, Bamonti-Catena F.<sup>1</sup>, Novembrino C.<sup>1</sup>, Cortelezzi A.<sup>1</sup>, Fracchiolla N.S.<sup>1</sup>, Di Cataldo D.<sup>1</sup>, Guggiari E.<sup>1</sup>, Ciani A.<sup>1</sup>, Maiolo A.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore-IRCCS, Via Sforza 35, 20122 Milano

Oxidative damage, caused by reactive oxygen metabolites (ROMs) and opposed by various antioxidant agents, also referred as oxidative stress, reflects an increase in pro-oxidant/antioxidant ratio. Pro-oxidant state induces tissue damage and may contribute to increase the risk of atherosclerosis. The body possesses a number of mechanisms to both control the production of ROMs and to limit or repair the tissue damage. The integrated antioxidant system comprises several components (preventive and scavenging antioxidants and repair enzymes). Among these, -SH groups are the first line components of antioxidant system.

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are chronic myeloid diseases marked by ineffective myelopoiesis, in which oxidative stress may play a pathogenic role.

Aim of the study was to investigate the possible involvement of the oxidative stress in MDS by measurements of ROMs, antioxidant system (Oxy-Adsorbent) and -SH group levels. We performed a cross-sectional study on 8 MDS patients (4M/4F, aged 42-94 mean 75 yrs) and 8 healthy volunteers (4M/4F, aged 41-79 mean 66 yrs), as controls (C).

ROMs, antioxidant barrier and -SH levels were determined on serum samples by spectrophotometric methods using d-ROMs test (Diacron), Oxy-Adsorbent test (Diacron) and -SHp test (Diacron). The Oxy-Adsorbent test is based on sample capability to adsorb the added oxidant solution (HClO).

Statistical analysis was performed using Wilcoxon's test.

	C (n = 8)	MDS (n = 8)
ROMS (U.Carr.)	255 ± 91.9	579 ± 142.4 *
OXY-ADS (µmol HClO/mL)	381 ± 25.5	285 ± 142.2
-SH (µmol/L)	365 ± 53.1	263 ± 94.6

\* p<0.01 vs C

Our preliminary data show the presence of oxidative stress in MDS patients: the significant increase of ROMs is not opposed by the defence system being both total antioxidant system and -SH groups decreased.

Cortelezzi A., Fracchiolla N.S., Bamonti-Catena F. et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in myelodysplastic syndromes: specific association with autoimmunity and cardiovascular disease. *Leukemia Lymphoma*, 2001: *in press*

EFFECTS OF ESTRADIOL AND GENISTEIN ON CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN HUMAN COLON CANCER CELL *IN VITRO*

Messa C., Pricci M., Cavallini A., Russo F., Di Leo A.

Laboratorio di Biochimica, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis", viale della Resistenza, 70013 Castellana Grotte (BA)

Epidemiological data suggest a protective role for estrogens and phytoestrogens in reducing the colon cancer risk. The estrogen receptor (ER) is required for the action of estrogens and recently a second ER, referred to as ER $\beta$ , has been demonstrated also in some human colon cancer cell lines. Previously, we reported that the exposure of two human gastric cancer cell lines (HGC-27 and AGS) to increasing 17 $\beta$ -estradiol concentrations causes an evident antiproliferative action in a dose dependent manner. In addition, estradiol seems to play a role in programmed cell death.

**Aim.** To investigate the possible mechanisms by which estrogen and estrogen-like compounds may influence the pathogenesis of colorectal cancer, we studied the effects of 17 $\beta$ -estradiol and genistein administration on proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line DLD-1.

**Materials and methods.** The proliferative response to treatment with 17 $\beta$ -estradiol or genistein was estimated by colorimetric MTT test. 17 $\beta$ -estradiol or genistein was added to the culture medium at concentrations ranging from 0.1nM to 40 $\mu$ M and from 0.1 $\mu$ M to 50 $\mu$ M respectively. The cells were harvested after 24 h of treatment. ER $\beta$  mRNA and protein expression were evaluated by RT-PCR and Western blotting, respectively. Apoptosis was investigated by DNA fragmentation using an enzyme immunoassay and agarose electrophoresis. Statistical analysis was performed by using paired t test. Difference were considered significant at a 5% probability level.

**Results.** DLD-1 cell line expressed ER $\beta$  at mRNA and protein level. The exposure of DLD-1 cells to increasing concentrations of 17 $\beta$ -estradiol or genistein showed an anti-proliferative action that became significant at the highest oestrogen or genistein concentrations, starting from 6 $\mu$ M and 30 $\mu$ M, respectively. Moreover, the exposure of DLD-1 cells to increasing concentrations of hormone or genistein gave rise to a significant marked pro-apoptotic effect at concentrations starting from 4 $\mu$ M and 10 $\mu$ M, respectively.

**Conclusions.** Our report provides additional evidence of an estrogenic involvement in the growth of ER $\beta$ -positive cultured DLD-1 cells. The capability of 17 $\beta$ -estradiol and genistein for growth inhibition and induction of apoptosis in human colon cancer cell is most relevant for understanding of chemoprevention.

**References.** 1) Messa C et al. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:753-8.

EXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTOR- $\alpha$  AND- $\beta$   
AND THEIR ISOFORMS IN HUMAN COLORECTAL  
CANCER

Cavallini A., Messa C., Di Leo A.

Laboratorio di Biochimica, Istituto di Ricovero e Cura a  
Carattere Scientifico "Saverio de Bellis", viale della  
Resistenza, 70013 Castellana Grotte (BA)

Estrogens influence the development and function of several organs including colorectal tract. The biological effect of estrogens are mediated via two intracellular proteins, the estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ). Additional ER isoforms, generated by alternative mRNA splicing, have been defined for both ER subtypes in several tissues and are postulated to play a role in tumorigenesis or in modulating the estrogen response. Moreover, to date, the understanding on the relative expression of two ER subtypes in human colorectal tract is more limited<sup>1</sup>, and any study has been reported for ER variant forms in this tissue. We have examined 20 human colorectal tumors matched with their adjacent normal mucosa to determine the ER expression and possible deletions of the exons 3 and 5 in both ER subtype at mRNA and protein level. Deletions of exon 3 or exon 5 may result in a truncated ER protein lacking much of the DNA-binding domain or ligand-binding domain, respectively. The semiquantitative RT-PCR analysis showed that the ER- $\beta$  mRNA levels were highest in colorectal tissue, whereas the immunoblot analysis showed that ER- $\beta$  proteins, expressed as arbitrary units (a.u.), decreased significantly ( $p=0.03$ ) from normal (median=130.0 a.u.) to pathological (median=85.0 a.u.) tissue. The same trend of ER- $\beta$  messenger was showed for ER- $\alpha$  mRNA, whereas the ER- $\alpha$  protein levels, as compared to ER- $\beta$  ones, were expressed at very low levels and the median values in two compartments (tumor and normal mucosa) were similar (38.0 a.u. and 42.0 a.u., respectively). The qualitative RT-PCR analysis demonstrated that only ER- $\alpha$  mRNA showed a deletion in exon 5 (D5) and this variant messenger not encoded for a protein mutated of approximately 42 kDa (ER- $\alpha$  wt= 67 kDa). Both forms (wt and D5) were coexpressed in all tumor samples and in 16/20 (80%) normal mucosa samples. Moreover the percentage median values of D5 form, relative to wt form, in tumor and in adjacent normal mucosa were similar (58.0% and 56.4%, respectively).

**Conclusions:** The regulation of ER- $\beta$  proteins during colorectal tumorigenesis may be subjected to a post-translation mechanism (down-regulation), whereas the presence of low ER- $\alpha$  protein levels may be generated by the alternative splicing variant of wt ER- $\alpha$  mRNA (D5).

**References:** 1) Foley et all. Cancer Res. 2000;60: 245-8.

PTH INTRAOPERATORIO: PREDITTIVITÀ DI  
SUCCESSO DELL'INTERVENTO CHIRURGICO

<sup>o</sup>Bugari G., <sup>o</sup>Iacobello C., <sup>o</sup>Mattana C., Busi D., \*De Nobili U.,  
<sup>o</sup>Albertini A.

<sup>o</sup>3 Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera

\*1a Chirurgia Generale, Azienda Ospedaliera

Spedali Civili, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia

Il successo terapeutico nella chirurgia degli Iperparatiroidismi (IPT), nonostante l'ausilio delle indagini di imaging preoperatoria e l'esame istologico intraoperatorio, è legato in gran parte all'esperienza del chirurgo che deve individuare e rimuovere il tessuto patologico al fine di ripristinare la normocalcemia. Nel nostro studio, in cui descriviamo l'esperienza del III Laboratorio nell'utilizzo del saggio intraoperatorio del PTH-intatto, abbiamo valutato la predittività del dosaggio nel valutare il buon esito della terapia chirurgica. Nello studio sono entrati 36 pazienti di cui 22 affetti da IPT primario (19 donne e 3 uomini) e 14 da IPT secondario a insufficienza renale cronica (3 donne e 11 uomini). Su tutti i pazienti in corso di intervento chirurgico sono stati eseguiti prelievi sierici seriati per determinare il PTH-intatto. Per il dosaggio è stato utilizzato il kit Intact PTH Turbo su analizzatore automatico Immulite One (Medical Systems, Genova). Nell'applicazione di tale dosaggio, il criterio utilizzato per valutare l'adeguatezza della resezione chirurgica era rappresentato dall'entità di caduta del livello sierico di PTH-i misurato a 10' dall'intervento rispetto al prelievo basale (tempo 0); tale riduzione per essere valutata significativa doveva essere maggiore del 50%.

Le Tabelle 1 e 2 mostrano l'elaborazione dei risultati ottenuti nelle due serie di pazienti, in funzione sia del cut-off utilizzato nella valutazione della caduta dei livelli di PTH-i, che dell'esito dell'intervento chirurgico nel follow-up condotto a 6 mesi o 1 anno.

Tabella 1

IPT	riduzione %	livelli PTH-i	numero
primario	livelli PTH-i	follow-up	pazienti
VERI positivi	> 50 %	normali	17
VERI negativi	< 50 %	elevati	2
FALSI positivi	> 50 %	indosabili	1
FALSI negativi	< 50 %	normali	2

Tabella 2

IPT	riduzione %	livelli PTH-i	numero
secondario	livelli PTH-i	follow-up	pazienti
VERI positivi	> 50 %	normali	10
VERI negativi	< 50 %	elevati	1
FALSI positivi	> 50 %	elevati	1
FALSI negativi	< 50 %	normali	2

Dall'analisi dei risultati degli IPT primari emerge che l'accuratezza del dosaggio del PTH-i intraoperatorio nel predire le conseguenze post-chirurgiche è dell'86.4 %, mentre i pazienti sono stati trattati correttamente nel 95.5% dei casi. Analogamente per gli IPT secondari si è avuta un'accuratezza del 78.6% ed un corretto intervento nel 93% dei casi.

*British Journal of Surgery* 1998, 85, 1129-1132.

*Surgery*, 1999 Volume 126, Number 6, 1132-1139