

TIPIZZAZIONE GENOMICA HCV: ARMONIZZARE  
ROUTINE E RICERCA NELLE AZIENDE OSPEDALIERE

Utech W., Battisti S., Caiola R., Leone G., Macrì M.

Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - Dir. Dott.ssa  
M. Macrì; A.O.R.N. "Antonio Cardarelli", via A. Cardarelli 9,  
80128 Napoli

*Scopo* del nostro studio è dimostrare l'indispensabilità della determinazione della tipizzazione genomica del virus dell'epatite C (HCV) considerando il numero sempre maggiore di richieste che perviene dalla medicina di base, dai Centri Trapianto e dalle U.O.C. di Epatologia per la valutazione dell'efficacia terapeutica.

*Obiettivo* del nostro studio è scegliere un metodo di tipizzazione genomica dell'HCV che fornisca una risposta adeguata ad ogni tipo di richiesta.

*Pazienti e Metodi:* Sono stati studiati 40 pazienti anti-HCV e HCV RNA-positivo (RT-PCR, Amplicor, ROCHE): 10 pazienti trattati con IFN $\alpha$ -2a(40KD)/RBV (ribavirina); 10 con IFN $\alpha$ -2b(12KD)/RBV/amantadina; 10 non responders; 10 pazienti asintomatici. Su tutti i campioni è stata determinata, a T0 e a termine terapia per i non responders, la sequenza nucleotidica della regione 5'NC (TRUGENE HCV 5'NC, VISIBLE GENETICS) e la tipizzazione genomica per ibridazione inversa (LiPA HCV - BAYER).

*Risultati:* La genotipizzazione ha dato risultati concordanti fra i due metodi in 33 dei 40 pazienti (82,5%). VISIBLE GENETICS ha consentito di tipizzare 2 pazienti (5%) con il 100% di omologia 2a vs 2a/2c LiPA - BAYER che, di contro, tipizzava (1b) 5 pazienti (12,5%) che al sequenziamento mostravano il 100% (2/5) ed il 99,5% (3/5) di omologia con il sottotipo 1a/1b.

*Conclusioni:* Il Kit LiPA HCV - BAYER, considerato il minor carico lavorativo ed il minor tempo di risposta, rappresenta un buon compromesso tra affidabilità e semplicità metodologica. Tuttavia la necessità della valutazione dei pazienti non responders, delle recidive post trattamento farmacologico e post trapianto di fegato rendono altresì indispensabile, nelle aziende ad alta specializzazione, l'utilizzo della tecnica di sequenziamento (VISIBLE GENETICS), in quanto solo con l'analisi degli elettrofenogrammi è possibile verificare la probabile presenza di più varianti virali nello stesso campione ed il riconoscimento di nuove varianti virali, inoltre consentirà la valutazione della farmacoresistenza basata sullo studio delle regioni NS3 ed NS5 con notevole risparmio "anche" della spesa sanitaria. Pertanto i due sistemi vanno, a nostro avviso, affiancati anche considerando che le tecnologie determinano l'efficacia dell'assistenza sanitaria e, se usate razionalmente, l'efficienza delle strutture sanitarie con il conseguente impegno delle risorse come condizione per garantire la tutela sanitaria dei Cittadini.

*Bibliografia:* *La spesa sanitaria, la diagnostica di laboratorio e il mercato delle tecnologie.* Centro studi Assobiomedica. Biochimica clinica, 1999, vol. 23, n. 6.

*THE SCIENTIFIC CHALLENGE OF HEPATITIS.* C. SCIENCE, 1999; 285: 26-30.

RICERCA DI VIRUS A RNA E DNA NELLO STESSO  
CAMPIONE BIOLOGICO: POSSIBILI APPLICAZIONI IN  
CAMPO TRASFUSIONALE

D'Alesio Y., Rosasco L., Primavera A., Mastrangioli P.,  
Puglielli S.

ASL N.1 Regione Abruzzo Av-Su, P. O. Sulmona  
Unità Operativa Complessa di Centro Trasfusionale -  
Divisione di Biologia Molecolare, Divisione di  
Oncoematologia, Direttore Dr. L. Geraci

**INTRODUZIONE:** I dati riportati in letteratura scientifica negli ultimi anni indicano come il rischio di infezioni da HBV, HCV, HIV associate alle trasfusioni si sia notevolmente ridotto, ma non fino a scomparire. Fino ad oggi la validazione sierologica degli emocomponenti si è basata su test sierologici validati dall'Istituto Superiore di Sanità in grado di determinare con elevata specificità gli antigeni di superficie dell'HBV e gli anticorpi specifici anti-HCV ed anti-HIV 1/2. Le tecniche di biologia molecolare NAT (Nucleic Acid Assay Technology) ad oggi disponibili, raggiungendo limiti di rivelazione genomica inferiori a 100 copie/ml risultano, più specifiche e più sensibili dei tests di screening sierologici. Le tecniche NAT consentono attualmente di ridurre la "fase finestra" sierologica del 50% per HBV ed HIV, e del 75% per HCV. **MATERIALI E METODI:** L'analisi è stata condotta su 300 unità di sangue. E' stata utilizzata la "Real Time" PCR, metodologia Taqman (SDS 7700 Applied). Viene eseguita una PCR non-nested e la sensibilità elevata è stata raggiunta aumentando il numero di cicli (50) di amplificazione. La sonda specifica per HBV è stata marcata con il fluorocromo TET, mentre quella per l'individuazione di HCV con il fluorocromo FAM. **RISULTATI:** Con il sistema descritto si è raggiunta la seguente sensibilità: 5 cp/ml. Non è stato trovato alcun donatore di sangue positivo per la presenza di virus e negativo per la presenza degli anticorpi relativi. Sono stati analizzati anche i campioni di pazienti positivi agli anticorpi -HBV, -HCV, sia per la determinazione quantitativa che per la determinazione qualitativa. **CONCLUSIONI:** Il sistema "real/time", chimica TAQMAN differisce dalle procedure di PCR standard per 1) l'aggiunta nella miscela di reazione della sonda fluorogenica interna che garantisce la specificità del prodotto amplificato; 2) la contemporanea informazione qualitativa che quantitativa (assoluta); 3) la certezza di determinare la sequenza realmente richiesta, in base all'uso di sonde specifiche per le sequenze amplificate; 4) la possibilità di rilevare contemporaneamente sequenze diverse, mediante uso di PCR multiplex e sonde specifiche marcate con fluorocromi diversi; 5) il tempo di reazione per ottenere un risultato è di circa 3 ore; 6) i costi sono notevolmente più bassi rispetto a quelli di altri kit preconfezionati attualmente in commercio.

**BIBLIOGRAFIA:** Mercier B., Burlot L., Ferec C. Simultaneous screening for HBV DNA and HCV RNA genomes in blood donations using a novel TaqMan PCR assay. J. Virol. Methods 1999 Jan; 77(1):1-9

Abe A., Inoue K., Tanaka T., et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. Clin. Microbiol. 1999 Sep; 37(9):2899-2903

## ANALYSIS OF GSTP1-1 POLYMORPHISM USING REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION ON THE LIGHT CYCLER

<sup>1</sup>Bellincampi L., <sup>1</sup>Ballerini S., <sup>1,2</sup>Bernardini S., <sup>1</sup>Iori R., <sup>1</sup>Cortese C., <sup>1,2</sup>Federici G.

<sup>1</sup>Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Rome, <sup>2</sup>Clinical Biochemistry, Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome,

**Background:** Glutathione transferases (GSTs) play an important role in the protection of cells from the products of oxidative stress as well as from several environmental carcinogens. Particular interest has been focused on the GSTP1-1 class because this gene class is up-regulated during the early stage of oncogenesis and is significantly overexpressed in many human tumors. Four allelic variants have been described for GSTP1-1 gene (\*A, \*B, \*C, \*D) leading to different aminoacid substitutions in position 105 and 114 of the protein sequence. The proteins encoded by the different alleles show different ability to metabolize carcinogens and anticancer agents suggesting an association between GSTP1 polymorphism and risk for a variety of cancers as well as response to cancer treatment (1).

**Methods:** The GSTP1-1 polymorphism was determined using a real time polymerase chain reaction and fluorescence resonance energy transfer with a Light-Cycler Instrument monitoring the PCR with specific hybridization probes. ARMS was used in case of \*A/\*C or \*B/\*D heterozygosity. We used this method to determine the GSTP1-1 polymorphism in 250 free-living Italian subjects of both sexes.

**Results:** Among 250 subject representative of an Italian population we observed the following allelic frequencies: f(A)=0.710, f(B)=0.236, f(C)=0.054 and f(D)=0. The observed phenotypes are in Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2 = 0.71$ , df = 4, P=0.95).

**Conclusions:** We have extended and improved a method of GSTP1-1 complete genotyping based on a hybridization probe-formatted PCR performed with Light-Cycler Instrument, possibly completed with ARMS. This method provides the ability to genotype 30 samples in two hours and it represents a fast, reliable and, as much as possible, automated methodology to determine the GSTP1-1 polymorphism in order to perform large scale population studies.

- 1) Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST\* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995; 30:445-600.

THIS RESEARCH WAS PARTIALLY SUPPORTED BY M.U.R.S.T., MINISTERO DELLA SANITÀ-ITALY (PROGETTO FINALIZZATO RFS 2000) AND CNR (PROGRAMMA "BIOTECNOLOGIE" 95/95).

## DIAGNOSI DI TROMBOFILIA IN ETÀ PEDIATRICA: CASE-REPORT DI UN PAZIENTE CON LESIONE ISCHEMICA CEREBRALE.

<sup>1</sup>Saura F., <sup>2</sup>Valeriani M., <sup>2</sup>Vigevano F., <sup>1</sup>Pancotti S., <sup>1</sup>Soldati M.

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù – IRCCS Roma; <sup>2</sup>Divisione di Neurologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù – IRCCS Roma.

**Introduzione.** Le trombosi su base genetica riguardano sia i fattori della coagulazione che quelli del sistema fibrinolitico e sono responsabili di circa il 10% delle tromboembolie. Queste alterazioni sono trasmesse come caratteri autosomici dominanti per cui anche gli eterozigoti presentano un notevole rischio e spesso hanno un esordio in età giovanile. La presenza di mutazioni a carico del Fattore V (G1691A) e del Fattore II (G20210A) sono tra i principali fattori di rischio per l'insorgenza di eventi trombotici (1). Mutazioni a livello di un enzima chiave nel ciclo dell'acido folico, la Metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR), portano all'accumulo nel plasma di omocisteina che rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza di malattie tromboemboliche (2).

**Case-Report.** Riportiamo il caso di un bambino di 7 anni giunto alla nostra osservazione con una distonia dell'arto superiore destro ed una paresi spastica dell'arto inferiore destro. La Risonanza Magnetico-Nucleare (RMN) dell'encefalo ha evidenziato un'area di alterata intensità di segnale, ipointensa in T1 ed iperintensa in T2 e FLAIR, in corrispondenza del nucleo caudato, del putamen e dell'ippocampo di sinistra, indicativa di esito di sofferenza parenchimale cerebrale su base ipossico-ischemica. Lo studio del DNA, mediante analisi di discriminazione allelica su Light Cycler (Roche), ha posto in evidenza la presenza di una mutazione in forma omozigote nel gene del Fattore II ed una condizione di eterozigosi per la mutazione a livello dell'enzima MTHFR (restrizione enzimatica con Hinf I). Da ulteriori indagini famigliari è emerso che entrambi i genitori ed il fratello, asintomatici, presentavano la mutazione a livello del Fattore II in forma eterozigote mentre per l'MTHFR il padre è risultato omozigote mutato ed il fratello eterozigote.

**Conclusioni.** Questo studio che descrive una lesione ischemica cerebrale di un paziente pediatrico in cui i fattori di rischio evidenziati sono rappresentati da mutazioni genetiche a livello della protrombina e dell'enzima Metilentetraidrofolato reduttasi, ripropone, a nostro avviso, la domanda sulla utilità o meno dello screening genetico in individui asintomatici.

- 1)Manco-Johnson MJ. Disorders of haemostasis in childhood: risk factors for venous thromboembolism. Thrombosis and Haemostasis. 1997Jul;78(1):710-4.
- 2)Frosst P. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat. Genet. 1995 May;10(1):111-3.

## ACTIVATED PROTEIN C RESISTANCE AND FACTOR V LEIDEN: COMPETITION AND HEALTH COST

Micelli M., Ranieri P., Coppola B.<sup>°</sup>, Roberto R.<sup>°</sup>, Masellis V.

Coagulation Laboratory, Policlinico, Bari; <sup>°</sup>Department of Biomedicine of Developmental Age, University of Bari

**INTRODUCTION:** APCR, acquired or congenital, causes an increased risk of venous thrombosis. Congenital APCR can be due to different mutations, the most frequent is the Leiden mutation. The aim of the study was to evaluate the physician behavior towards the APCR/V Leiden phenomenon and the consequence on health cost.

**METHODS:** We evaluated if FV Leiden molecular analysis was or not matched with APCR analysis in 195 consecutive patients during the 2001. We also verified APCR results as regards the molecular analysis. The Leiden mutation was analyzed with the classical Bertina method and the APCR test, both with the conventional and the FV modified method, using the APTT-based assay from Chromogenics-Sweden.

**RESULTS:** In 82/195 samples (42%) both DNA and APCR analysis was requested; 162/195 DNA analysis (83%) resulted wild type and 33/195 (17%) resulted FV Leiden. In the 70% of the wild type samples and in the 48.5% of the Leiden mutation just molecular analysis was requested. The concordance between DNA analysis and both APCR methods was 100%. We didn't find acquired APCR.

**DISCUSSION:** In the majority of the requests (58%) only DNA analysis was asked with the loss of clinically useful information: the acquired APCR and mutations different from the Leiden one. DNA analysis performed in 83% of wild type samples elevated the health cost because the DNA analysis costs • 110,01. The APCR method costs • 9,04 and its sensitivity and specificity is 100%. The preference for the molecular analysis could be due to the diffusion of the "Leiden" term in the scientific literature without knowledge of biological APCR phenomenon and to the false opinion that molecular analysis is definitive and infallible towards the presumed variability of biochemical methods. To assume that normal results with the FV modified method exclude FV mutation and to confirm positive results with DNA analysis to distinguish heterozygotes and homozygotes could be a reasonable strategy. DNA analysis could be the only approach in the lupus anticoagulant. Scientific society guidelines could improve the clinical approach and the health costs.

## DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL'ANTICOAGULANTE LUPICO: PERFORMANCE DI TRE TEST DI CONFERMA

Montaruli B., Plateroti S., Martini A., Invidia M.L., Napoli P., Cavagna L., Saitta M.

Laboratorio Analisi, CIOV – Ospedale Evangelico Valdese – Torino

L'anticoagulante lupico (LA) e gli anticorpi anticardiolipina (aCL) costituiscono un gruppo eterogeneo di immunoglobuline, gli anticorpi antifosfolipidi (aPL), fortemente associati con trombosi arteriose e/o venose, aborti ricorrenti e piastrinopenia. I test di conferma rappresentano un passaggio obbligato seppur difficoltoso nell'algoritmo diagnostico del LA, in quanto spesso artigianali e difficilmente automatizzabili. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare e confrontare con lo STACLOT-LA le caratteristiche di performance di due test di conferma alternativi al kit della Stago: il Silica Clotting Time (SCT) e il Platelet Neutralization Procedure (PNP) eseguiti in assenza e ad alta concentrazione di fosfolipidi. Il plasma di 40 campioni con storia di tromboembolismo attribuibile alla sindrome da aPL è stato raccolto e studiato. Su tutti i campioni sono stati eseguiti i seguenti test di conferma per la ricerca del LA: STACLOT-LA (Stago); PNP: aPTT-SP (IL) a bassa e alta concentrazione di fosfolipidi piastrinici (Platelet Extract Reagent, Bio/Data Corporation); SCT a bassa e alta concentrazione di fosfolipidi piastrinici (Platelet Extract Reagent, Bio/Data Corporation).

Lo StacLOT-LA è stato considerato diagnostico per presenza di anticorpi LA quando la differenza dei tempi di coagulazione prima e dopo aggiunta di fosfolipidi esagonali è risultata superiore al cut-off (7 secondi); il PNP quando la differenza dei tempi di coagulazione prima e dopo aggiunta di fosfolipidi piastrinici è risultata superiore a 8 secondi; il SCT quando la ratio ottenuta dividendo i tempi di coagulazione espressi in secondi in assenza e in presenza di fosfolipidi piastrinici è risultata superiore a 1,87.

25/40 campioni i plasma analizzati sono risultati positivi con lo STACLOT-LA. La mediana e il (range) della differenza dei tempi di coagulazione ottenuti prima e dopo aggiunta di fosfolipidi esagonali sono risultati: 21,4 (8-144) secondi. Tutti i 25 campioni positivi allo STACLOT-LA sono risultati inoltre positivi sia con il test PNP [mediana e (range) della differenza dei tempi di coagulazione: 17,5 (8-133)], che con il test SCT [mediana e (range) 2,29 (2,03-5,339)]. 4/15 campioni STACLOT-LA negativi sono risultati PNP positivi, 3 di questi sono risultati anche SCT positivi. In conclusione sia il PNP che il SCT eseguiti a bassa e alta concentrazione di fosfolipidi possono essere considerati validi quanto lo STACLOT-LA nella ricerca degli anticorpi LA. I vantaggi del SCT e del PNP sono la più facile automazione sui coagulometri, i più bassi costi e il fatto che non prevedendo la prediluizione con normal pool permettono, forse, di identificare meglio quei campioni con bassi livelli di inibitori.

PROTEINA S FUNZIONALE VERSUS PROTEINA S FREE  
IN CORSO DI LAC, DI AUMENTATA RESISTENZA ALLA  
PROTEINA C ATTIVATA E DI TRATTAMENTO  
ANTICOAGULANTE ORALE

Grassini A., Cancellieri E., Vagni A., Montanelli A.

Patologia clinica, Ospedale Maggiore di Crema.

**Introduzione** La proteina S è una glicoproteina vitamina K dipendente che circola nel plasma in due forme distinte e in dinamico equilibrio: il 30% in forma libera funzionalmente attiva, il 70% legata al complesso C4bBP. La rilevanza clinica di questo inibitore è dimostrata dall'elevata incidenza di episodi trombotici in pazienti affetti da deficienza congenita. Storicamente la misura della proteina S prevedeva la precipitazione del complesso C4bBP-proteina S con PEG; successivamente sono stati messi a punto test in ELISA che presentano indubbi vantaggi e alcuni potenziali limiti e recentemente è stato dimostrato che la misura della proteina S libera è la determinazione più idonea per valutare lo stato carenziale, fattore di rischio trombofilico.

**Materiali e metodi** Sui plasmi di: 12 soggetti selezionati come controlli normali, 6 pazienti con LAC, 5 pazienti con aumentata aPCR e 5 pazienti in TAO abbiamo effettuato un duplice dosaggio della proteina S: funzionale e quantitativo della frazione libera.

L'attività della proteina S è stata determinata con un test coagulativo basato sul prolungamento dell'aPTT in presenza di APC e Fattore V attivato (STA protein S clotting-Roche-).

La frazione libera è stata misurata con un metodo immunoturbidimetrico al lattice completamente automatizzato (STA Liatest free protein S-Roche). Il test prevede l'utilizzo di un monoreagente pronto all'uso e non necessita di calibrazione sullo strumento in quanto la stessa è acquisibile dalle informazioni contenute nel barcode del kit commerciale. Le performance del test sono state monitorate con l'adozione e processazione di plasmi di controllo del commercio.

**Risultati** I dati ottenuti evidenziano:

- Nei soggetti normali: buona correlazione delle due misurazioni.
- Nei pazienti con LAC: in un caso dosaggio di PS funzionale > PS free (prolungamento del tempo di coagulazione e inibizione della aPC da parte dell'attività LAC).
- Nei pazienti con aumentata resistenza alla proteina C attivata: buona correlazione.
- Nei pazienti in TAO valutazione PS funzionale < valutazione della PS free (giustificabile dalla presenza di forme acarbosilate e quindi funzionalmente inattive di proteina S originate dal trattamento anticoagulante).

**Conclusioni** Il test per il dosaggio della proteina S libera presenta indubbi vantaggi di praticabilità e sembra sufficientemente sensibile e specifico: in particolare nella nostra casistica non ha evidenziato, diversamente dal dosaggio funzionale, interferenze riferibili alla presenza di LAC. Si candida pertanto ad affiancarsi nella pratica clinico/diagnostica all'utilizzo routinario del dosaggio funzionale della proteina S con metodo coagulativo.

ANTICARDIOLIPIN AND ANTI BETA(2)-  
GLYCOPROTEIN I ANTIBODIES: THEIR IMPORTANCE  
AS RISK FACTOR FOR THROMBOTIC EVENTS

Brusca I.#, Fazio M.\*, Sarullo F.M.§, Pristina T.#, D'Angelo A., Castello A.§, La Chiusa S.#

Servizio di Patologia Clinica#-Divisioni di Medicina\* e Cardiologia§, Ospedale "Buccheri La Ferla", Palermo

**BACKGROUND:** Anticardiolipin and anti beta(2)-Glycoprotein I antibodies have been associated with thrombotic events. The purpose of the present study was to investigate the relationship between anticardiolipin (aCL), and anti beta(2)-glycoprotein I antibodies (a-beta2GPI), their association with increased risk of ischemic stroke (I.S) and myocardial infarction (M.I.) and the occurrence of clinical recurrence of ischemic events as I.S, M.I, unstable angina or Transient Ischemic Attack (T.I.A.) during a median follow-up of 21 months.

**METHODS:** 127 consecutive patients (mean age 60.1+/-11.8 years) admitted to the Department of Medicine or to the Intensive Care Unit of our Hospital were involved in the study, and risk factors for ischemic events were recorded. The study group consisted of 61 men and 66 women with M.I (n=65), I.S (n=41), T.I.A. (n=21). The control group consisted of 60 sex matched healthy individuals (mean age 54.4+/-13.6 years). aCL IgG, IgA and IgM and a-beta2GPI were measured with ELISA methods (INOVA, San Diego California). The mean + 2 standard deviations of each test in controls was chosen as the cutoff point. Omocysteine and cholesterol levels as well as other traditional risk factors were also determined (data not shown).

**RESULTS:** 100/127 patients (78.74%, 95% C.I. 70.72-86.76) had antiphospholipid antibodies, 46/100 had simultaneously aCL and a-beta2GPI (46.00% 95% C.I. 36.23-55.77), 23/100 were aCL+ a-beta2GPI- (23.00% 95% C.I. 14.75-31.25), 31 were aCL- a-beta2GPI+ (31.00%; 95% C.I. 21.94-40.06). The Spearman Rank correlation coefficient between aCL and a-beta2GPI in the control group was r=0.925, in the ischemic group was r=0.913. In respect of the control group the odds ratio for the aCL+ group was 3.91 (95% C.I. 1.96-7.81), the odds ratio for the a-beta2GPI+ group was 6.16 (95% C.I. 2.98-12.73). The risk of ischemic events was significantly increasing in aCL+ a-beta2GPI+ patients compared with control group: odds ratio 7.95 (95% C.I. 2.71-23.34). The odds ratio of aCL+ a-beta2GPI- were 1.11 (95% C.I. 0.49-2.50); the odds ratio of aCL- a-beta2GPI+ patients were 2.10 (95% C.I. 0.90-4.90). Subsequently 82 patients had ischemic events; 34/82 were aCL+ a-beta2GPI+ patients, (41.46%, 95% C.I. 31.81-51.12), 14/82 were aCL+ a-beta2GPI- patients, (17.07%, 95% C.I. 9.70-24.45), 19/82 were aCL- a-beta2GPI+ patients, (23.17%, 95% C.I. 14.90-31.44). The risk of ischemic events in the follow-up has also increased in aCL+ a-beta2GPI+, (odds ratio 2.19; 95% C.I. 0.97-4.92), but without statistical significance.

**CONCLUSION:** these data suggest that aCL, particularly the beta2GPI dependent variety, according to recent reports (1), is an important predictor of ischemic events.

1) Brey et al. Stroke. 2001; 32(8): 1699-700

## INTERVALLI TERAPEUTICI NEL CONTROLLO DELLA TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE ED INTERPRETAZIONE DEGLI INR BORDERLINE RISPETTO AL CAMBIO DI DOSE DEL FARMACO. SIGNIFICATO SOLAMENTE CLINICO?

Introcaso G., Gesu G., Raggi M., D'Errico T.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Sezione di Coagulazione, IRCCS, Centro Cardiologico "Monzino", via Parea 4, 20138 Milano

Background Trials clinici hanno definito i range terapeutici di INR 2-3 e di INR 2,5-3,5 a seconda del grado di anticoagulazione richiesta. I limiti terapeutici di INR 2, 3, 2,5, 3,5, rappresentano il numero di volte con cui è moltiplicata la media geometrica del PT di almeno 20 plasmi normali, considerando la correzione per l'ISI della tromboplastina utilizzata. I range terapeutici, quindi, non possiedono un significato biochimico come per altre misurazioni di laboratorio, relativamente all'ambito di riferimento normale o patologico, pertanto a livello dei limiti terapeutici l'incertezza dell'INR è massima. Ne consegue che, il monitoraggio dell'anticoagulante per valori terapeutici "borderline" risulta arbitrario o in ogni caso empirico. Scopo della nostra indagine è definire il significato statistico dei limiti terapeutici e quindi dei range di anticoagulazione. Metodi Analisi longitudinale: 41 pazienti in TAO sono stati selezionati secondo i seguenti criteri: assenza di complicanze trombotiche o emorragiche, valori di INR in range terapeutico con distribuzione normale delle determinazioni. Durante circa un anno di terapia, 804 valori di INR relativi ai due range terapeutici 2-3 (N=267) e 2,5-3,5 (N=537) sono stati analizzati tramite la media, la deviazione standard (SD), la varianza ed il coefficiente di Curtosi. Tramite software (SPSS 9.0) è stata valutata la probabilità cumulativa (p) per i limiti terapeutici o singoli valori di INR. Abbiamo costruito le curve di probabilità sperimentali e teoriche come segue: curve sperimentali, utilizzando i dati dei 41 pazienti in TAO, curve teoriche considerando la (SD) ideale tra i valori di 0,5 e 0,25 nel definire la dispersione dei valori di INR all'interno degli intervalli terapeutici. Analisi trasversale: in un periodo successivo di 6 mesi di terapia abbiamo selezionato N=2414 determinazioni di INR nel range di accuratezza dell'INR (1,5-4,5). Dei valori di INR, sono stati calcolati la media, deviazione standard, varianza e coefficiente di Curtosi relativi a pazienti anticoagulati secondo il range terapeutico INR 2-3 e 2,5-3,5. Per le misure del PT è stata utilizzata tromboplastina ad alta sensibilità ISI ≤ 1,1 (Dade Behring). Risultati In entrambe le valutazioni longitudinale e trasversale, le distribuzioni dei valori di INR sono risultate normali secondo il coefficiente di Curtosi compreso tra -1 e +1. I valori centrali hanno evidenziato una lieve sottostima rispetto al valore medio atteso di INR per range terapeutico. I dati di dispersione, come deviazione standard (SD) per i range 2-3 e 2,5-3,5 dell'analisi trasversale e per il range cumulativo 1,5-4,5 dell'analisi longitudinale, sono stati i seguenti: SD=0,59, SD=0,75, SD=0,66 rispettivamente. Le curve di probabilità ottenute con SD=0,5 hanno descritto in modo soddisfacente i risultati di fluttuazione dell'INR come SD, di conseguenza le distribuzioni di INR ottenute evidenziano che ai limiti terapeutici 2, 3, 2,5 e 3,5 il livello di probabilità è pari a p=0,16 cioè uguale alla probabilità corrispondente ai limiti ottenuti come media ± 1SD. Per INR prossimi ai limiti terapeutici o borderline (2,5±0,5) o (3±0,5) a seconda del range terapeutico, il valore di probabilità (p), quindi, non è significativo. Interpretazione e Conclusioni Si evidenzia che per le analisi longitudinali e trasversali, gli indici di dispersione SD dei valori di INR sono comparabili. Tali dati tratti dal monitoraggio della TAO mostrano che è verosimile una SD=0,5 cioè una varianza uguale a 0,25 come indice ideale di dispersione delle determinazioni di INR. Si osserva che per due valori successivi di INR prossimi ai limiti terapeutici con p=0,16, il prodotto delle probabilità risulterebbe p=0,025 quindi con significatività statistica. Pertanto, per INR borderline il cambio di dose dell'anticoagulante richiederebbe almeno un test successivo tale da confermare una situazione in-range o out-range. L'interpretazione biochimico-statistica dei risultati di INR insieme alla valutazione clinica potrebbe ottimizzare il monitoraggio della TAO.

Bibliografia: 1) Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series, N° 889, 1999; 2) A proposed therapeutic control chart with INR cumulative probability for oral anticoagulant monitoring, Introcaso G. et al. Supplement to the journal Thrombosis and Haemostasis, July 2001 abstract (P826).

## ACTIVATED FACTOR TWELVE ASSOCIATED TO ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AS A MARKER OF THROMBOSIS EARLY IN CEREBROVASCULAR ISCHEMIC DISORDERS.

De Lucia D.(1), Pignalosa O.(1), Maisto G.(1), Del Giudice V.(1), Marotta R.(1), De Francesco F.(1), Sorrentino M.(1), Papa M.L.(2), Molinari A.M.(1), Fratta M.(1), Sica V.(1), Cozzolino C.(3), Cavalcanti E.(3), Dente B.(3)

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

Cerebral 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 hyperfibrinogenemia (> 340 mg/dL), high FVIIa and FVIII levels (> 150 IU/dL, >155 IU/dL respectively), high levels of antiphospholipid antibodies/aPL Abs (> 20.0 U GPL/mL), F1+2 (>1.1 nM) and D-Dimer(s) (> 450 ng/mL). For these observations, it is now mandatory to have a screening assay which is able to recognize this combination of defects.

We aimed to evaluate activation of FXII (FXIIa), FVIIa, and peptides released during thrombin generation (prothrombin fragment 1+2/F1+2, thrombin-antithrombin complex/T-AT, and fibrinolysis (D-dimer/DD) in ischemic stroke patients (cardioembolic and atherothrombotic subtypes) with (n=40) and without (n=30) aPL Abs. Seventy healthy subjects acted as a control group. FXIIa (Shield Diagnostics Ltd), T-AT and F1+2 (Enzygnost, Dade Behring), and DD (Dimertest, Roche) were assessed by ELISA method. FVIIa was measured using a recombinant mutant form of human tissue factor (TF 219) as a cofactor for FVIIa catalysed activation of FX.

FXIIa levels in aPL (+) stroke patients were significantly higher (10.86±2.48 ng/mL) than in aPL (-) stroke patients (2.49±1.75 ng/mL) and normals (1.15±0.37 ng/mL), which was further associated with a history of cerebral thrombosis (p= 0.021). Patients with high aPL titers had significantly elevated T-AT (6.5±3.5 µg/mL vs 2.85±2.25 µg/mL and 2.45±2.05 µg/mL), F1+2 (2.55±2.05 nM vs 0.95±1.05 nM and 0.45±0.35 nM), DD (635±245 ng/mL vs 375±225 ng/mL and 355±175 ng/mL) and FVIIa (2.80±1.95 ng/mL vs 1.40±1.55 ng/mL and 1.20±1.35 ng/mL) levels compared to aPL (-) patients and controls, thus reflecting a generalised prothrombotic state.

The authors feel that the mechanism of FXIIa generation in cerebrovascular ischemic patients is unknown, but may reflect activation of the plasma kallikrein/kinin system on damaged endothelial cells activated by high titers of aPL(s).

## VALUTAZIONE DEI CRITERI PER LA DEFINIZIONE DELLE SPECIFICHE DI QUALITÀ

<sup>1</sup>Zardo L., <sup>1</sup>Sciacovelli L., <sup>1</sup>Secchiero S., <sup>1,2</sup>Plebani M.

<sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco V.to (TV)

<sup>2</sup>Servizio Medicina di Laboratorio, Az. Osp. di Padova

Il punto di partenza in un progetto per la qualità deve essere la definizione dei limiti di tolleranza del processo. Nel caso del laboratorio i limiti di tolleranza sono i requisiti di qualità del test analitico che dipendono innanzitutto dalla definizione degli obiettivi analitici. In questo lavoro è stata valutata l'applicabilità degli obiettivi analitici individuati sulla base dei criteri proposti dalla Consensus Conference del 1999 (clinico, biologico, basato sullo stato dell'arte, utilizzato nei Programmi di VEQ). In particolare è stata effettuata una valutazione dei risultati, ottenuti nel ciclo 2001 nei programmi di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica (CRB), calcolando per alcuni analiti di particolare interesse clinico, per es. colesterolo, glucosio, sodio, emoglobina glicata, la percentuale di prestazioni che rientrano nei limiti di accettabilità. Da questa valutazione, relativamente al **colesterolo**, si osserva che l'obiettivo clinico (Eta=7.95%), è raggiunto dalla quasi totalità dei risultati (93.3%) e l'obiettivo biologico (Eta=9.0%), essendo più ampio di quello clinico, è raggiunto da una percentuale ancor maggiore (95.4%). L'obiettivo utilizzato nel programma di VEQ del CRB (Eta=6.3%), ristretto rispetto a quello biologico per stimolare i laboratori al miglioramento delle proprie prestazioni, è raggiunto comunque dall'87.3% dei risultati. Anche se l'attuale tecnologia consentirebbe di restringere ulteriormente questo obiettivo (infatti la variabilità interlaboratorio media ottenuta sui dati dei partecipanti allo Schema di VEQ del CRB, è pari al 3.3%) si ritiene che ai fini dell'utilità clinica gli sforzi necessari a mantenere tale livello di qualità non siano giustificabili. Inoltre utilizzando l'obiettivo basato sullo stato dell'arte (Eta=3.3%) la percentuale di risultati con prestazioni non accettabili sarebbe elevata (circa 40%) e potrebbe scoraggiare l'attuazione di azioni mirate al miglioramento. Dalla valutazione dei vantaggi e degli svantaggi dei diversi criteri utilizzati per la definizione degli obiettivi analitici emerge che l'approccio ideale è probabilmente quello proposto da Westgard, finalizzato a promuovere e facilitare il confronto delle diverse raccomandazioni (basate sull'outcome clinico, sulla variabilità biologica e su indicazione di esperti) e dei requisiti di qualità analitica (imprecisione, inaccuratezza, errore totale) che oggi esistono, tenendo conto di come i risultati dei test di laboratorio sono utilizzati nella pratica clinica. L'utilizzo di un obiettivo individuato, per esempio, su un criterio clinico, può risultare efficace ai fini di uno screening di malattia ma non altrettanto utile per situazioni di monitoraggio. Spetta, quindi, allo specialista di laboratorio definire appropriati traguardi analitici che possano realmente integrarsi nel processo di valutazione dello stato di salute del paziente. Petersen PH et al. Scand J Clin Lab Invest 1999;59(7).

## ACCREDITAMENTO DEI PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ (VEQ)

<sup>1</sup>Sciacovelli L., <sup>1</sup>Secchiero S., <sup>1</sup>Zardo L., <sup>1</sup>Fietta MB., <sup>1,2</sup>Plebani M.

<sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco V.to (TV),

<sup>2</sup>Servizio Medicina di Laboratorio, Az. Osp. di Padova.

La partecipazione attiva del laboratorio a Programmi di VEQ è un elemento fondamentale per garantire l'affidabilità dei risultati forniti e rappresenta un requisito indispensabile per l'implementazione dei processi di accreditamento dei laboratori clinici. Vi è, quindi, una reale esigenza da parte dei laboratori di partecipare a Programmi di VEQ che rispondano a requisiti di affidabilità ed efficacia. Gli Schemi di VEQ, attualmente, sono gestiti da Organizzazioni diverse e differiscono per il modello e i criteri che si basano sulle varie raccomandazioni scientifiche che sono state pubblicate negli anni. Il Centro di Ricerca Biomedica (CRB) ha seguito il processo di accreditamento dei Programmi di VEQ del Clinical Pathology Accreditation (CPA-EQA) per ottenere un riconoscimento della validità dei propri Schemi. L'obiettivo principale del Programma EQA-CPA è che gli Schemi di VEQ soddisfino appropriati criteri e siano in grado di evolversi sulla base di nuove esigenze, al fine di aiutare i laboratori a mantenere gli obiettivi di prestazione. Gli standard, che si ispirano alle norme ISO 9000 e ISO Guide 43, sono divisi in due sezioni: la prima si focalizza sulle specifiche degli Schemi; la seconda riguarda il sistema qualità dell'Organizzazione che gestisce i Programmi. Vista, quindi, l'esigenza da parte dei laboratori di partecipare a Programmi di VEQ che siano riconosciuti, e la disponibilità di standard specifici per l'accREDITAMENTO degli Schemi di VEQ, è auspicabile che tutte le Organizzazioni che gestiscono Schemi di VEQ intraprendano il cammino dell'AccREDITAMENTO. Il processo di accREDITAMENTO è importante sia per gli Organizzatori degli Schemi che per i Laboratori. Per gli Organizzatori perché fornisce un riconoscimento formale che le attività svolte e i criteri adottati sono conformi a requisiti riconosciuti a livello internazionale e valutati mediante una visita ispettiva da professionisti del settore; per i Laboratori perché la partecipazione a Programmi accREDITATI fornisce loro garanzia dell'affidabilità degli Schemi. Inoltre, è da sottolineare, che un Programma di VEQ accREDITATO si inserisce più facilmente nei progetti di collaborazione internazionale. L'accREDITAMENTO degli Schemi di VEQ del CRB dovrebbe rappresentare uno stimolo per tutti gli organizzatori di VEQ a realizzare l'auspicata collaborazione che porti alla costituzione di Programmi nazionali, prima, ed internazionali, dopo, ed interagire sempre più efficacemente con il laboratorio nel processo di miglioramento continuo delle prestazioni fornite. Bibliografia: Sciacovelli L. Secchiero S., Zardo L. Plebani M. External Quality Assessment Schemes: need for recognised requirements. Clin Chim Acta 2001;309:183-99.

## LA QUALITÀ PERCEPITA DEL LABORATORIO ANALISI; RISULTATI DI UN QUESTIONARIO PROPOSTO AGLI UTENTI AMBULATORIALI

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

Laboratorio Analisi -Azienda Ospedaliera "Umberto I"-Ancona

Per conoscere il grado di soddisfazione degli utenti ambulatoriali, con l'obiettivo di migliorare la qualità del servizio offerto, è stato proposto un questionario.

**Materiali e metodi** Il questionario era costituito da n.20 domande a risposta multipla o libera, in cui si richiedeva una valutazione globale sulla attività del laboratorio e veniva indagata la qualità percepita relativamente alla professionalità e cortesia degli operatori nei tre momenti successivi di attesa della prestazione, esecuzione del prelievo e ritiro del referto e relativamente alle condizioni igieniche ed al rispetto della riservatezza. Gli utenti sono stati invitati inoltre a fare critiche e dare suggerimenti. Il questionario è stato proposto a un campione di n.225 utenti scelti casualmente e per un periodo di quattro settimane; l'operatore che proponeva il questionario si è limitato a rispondere ad eventuali richieste di chiarimenti.

**Risultati** Hanno partecipato alla compilazione del questionario n.135 F e n.90 M; la fascia di età più rappresentata è stata quella compresa fra 60 e 69 anni (28%). L'elaborazione delle risposte ha mostrato che l'81% aveva eseguito esami negli ultimi 12 mesi, che il 76% aveva già richiesto prestazioni al nostro laboratorio ed il 33% lo aveva scelto per fiducia; il 50% era rimasto presso il centro prelievi meno di 30' e il 63% aveva atteso meno di 15' prima del prelievo. Il 76% ha espresso un giudizio molto positivo sulle condizioni igieniche della sala d'attesa ed il 74% ha giudicato positivamente il rispetto della persona e della riservatezza. Il 66% ha ritenuto molto cordiali ed il 57% molto preparati gli operatori della segreteria; il 74% ha ritenuto molto cordiali ed il 67% professionalmente molto preparati gli operatori sanitari; il 96% ha giudicato accettabile il tempo di attesa del referto ed il 65% dei 54 utenti, che hanno chiesto spiegazioni, ha affermato che i chiarimenti ricevuti relativamente al referto erano molto chiari. Confrontando i questionari compilati dai nuovi utenti con quelli degli utenti che avevano già richiesto prestazioni al nostro servizio non si sono osservate differenze nella distribuzione delle risposte. Il 28% degli utenti ha fatto osservazioni e ha dato suggerimenti; i più riferivano il disagio nel pagamento del ticket in sede separata dalla segreteria ed auspicavano una maggior cura della riservatezza.

**Conclusione** L'analisi dei risultati del questionario ha rilevato che gli utenti sono sostanzialmente soddisfatti; il giudizio globale sul servizio offerto è stato positivo con un punteggio medio di 9/10. Decisamente positivo è risultato il giudizio sulla professionalità e cortesia degli operatori sanitari e amministrativi. I suggerimenti forniti ci inducono a migliorare e ad impegnarci per dare agli utenti risposte adeguate alle loro richieste.

Plebani M, Chiazza ML: *Audit in Laboratory Medicine. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1996; 34:655-57.*

## "IL SISTEMA QUALITÀ" SECONDO LE NORME UNI EN ISO 9000:2000 APPLICATO AL LABORATORIO DI ANALISI DEL DISTRETTO 48 DELL'A.S.L. NAPOLI I

Terracciano N.\*, Corsi G, Moro R.A., Abete O.\*, Maiorano G\*, Alterio A.\*, Spiteri C.\*\*, Spiteri D.

A.S.L. NA I Distretto 48, Laboratorio Analisi chimico cliniche, Direttore Dr D. Spiteri, \*\*Statistical Assistano; \*P.O. "Ascalesi", Servizio Virologia, Primario Prof. R. Smeraglia

### Premessa

Nel cammino della Sanità pubblica, che va verso le esigenze del cittadino-cliente, è fondamentale l'attenzione al miglioramento continuo del servizio offerto. Due sono gli strumenti a disposizione, la Carta dei Servizi e il Sistema Qualità, secondo la normativa dettata dalla Organizzazione Internazionale di Standardizzazione. L'inadeguata conoscenza, da parte dei clienti, delle Carte dei Servizi rende inattuabile questa disposizione di legge, pertanto, gli standard proposti non possono essere messi in atto con rigore.

Le norme UNI EN ISO nella loro ultima versione 9000:2000, prescindendo dal controllo esterno degli utenti-clienti, assoggettano l'Azienda Sanitaria ad una sequenza procedurale stabile e ripetitiva, che tende ad esercitare un autonomo controllo, attuando un crescendo qualitativo in chiave di aumento della competitività, dell'efficacia, dell'efficienza, della qualità dell'assistenza, ed infine della soddisfazione del cliente. Le Vision, in particolare, enfatizzando l'importanza delle azioni preventive, aiutano a ridurre al minimo gli stress del Sistema di Gestione della Qualità.

### Materiali metodi e tecniche

Rilevazione del clima interno: test motivazionali per creare il giusto clima di collaborazione. Rilevazione della Customer Satisfaction: la soddisfazione degli utenti, elaborata statisticamente, dà le direttive per il primo piano di attuazione della normativa. Documentazione del sistema gestione qualità: L'impianto del SGQ richiede i seguenti documenti: Manuale della Qualità; Procedure; Istruzioni operative, Rapporti e Documenti di registrazione.

L'attuazione documentata di sei procedure relative al: Controllo dei documenti, Controllo delle registrazioni per la qualità, Verifiche ispettive interne, Controllo delle non-conformità, Azioni correttive, Azioni preventive.

### Conclusioni

Solo una continua verifica della qualità, potrà servire a creare l'equilibrio indispensabile a un sistema che sconta, da un lato, la scarsità delle risorse e dall'altro, la crescente e diversificata domanda di benessere dei cittadini. Il tradizionale assunto che sostiene che maggiore qualità sia associata a maggiori costi, non tiene conto del valore inestimabile del prodotto Salute e seppure effettivi aumenti di costo in alcune aree possono verificarsi, questi porteranno una diminuzione delle spese totali, grazie alle economie in altri settori e non di meno al miglioramento qualitativo del "benessere psico-fisico dei pazienti" (O.M.S.).

### Rif. Bibliografici:

Negro G, (2001), Organizzare la qualità nei servizi, Milano Il Sole 24 ore Media e Impresa S.p.A.

## INTEGRAZIONE NEL SISTEMA GESTIONALE DI LABORATORIO DELLA VALUTAZIONE DEL "SISTEMA QUALITÀ"

Colacicco L., Callà C., Lipa S., \*Palagiano C., \*Giordani P., Giardina B., Gozzo M.L.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del S. Cuore, Largo A. Gemelli n°8, 00168 Roma  
\*GESI - Gestione Sistemi per l'Informatica s.r.l - via Rodi n°32, 00195 Roma.

L'efficienza dei Sistemi Qualità che vengono sempre più diffusamente implementati nei laboratori di analisi cliniche, deve essere mantenuta nel tempo e se possibile migliorata. Si crea quindi l'esigenza di introdurre opportuni indicatori per il monitoraggio delle attività manageriali e tecniche che determinano la qualità del servizio.

Il nostro obiettivo è stato quello di elaborare specifici indicatori di qualità sfruttando i dati già disponibili nel sistema gestionale del laboratorio.

Nel nostro laboratorio è attivo un Sistema Qualità accreditato dal Clinical Pathology Accreditation (CPA) ed è operativo, sin dal 1992, il software gestionale DALI, realizzato da GESI (Gestione Sistemi per l'informatica) S.r.l. nell'attuale release 3.00

La stretta collaborazione tra il nostro laboratorio e GESI ha consentito l'integrazione nel sistema gestionale DALI delle procedure di calcolo, finora eseguite a parte, per il monitoraggio della Qualità Analitica in tempo reale ed a lungo termine, con il vantaggio della archiviazione e storicizzazione di tutti i parametri contestualmente ai risultati analitici. Inoltre la nuova configurazione del sistema gestionale ci ha permesso di implementare il controllo dell'adeguatezza degli intervalli di riferimento in uso, mediante il confronto con le distribuzioni di frequenza dei risultati dei pazienti.

Il modulo di qualità integrato in DALI è stato ulteriormente sviluppato allo scopo di definire, utilizzando informazioni già presenti nel sistema, nuovi indicatori di qualità applicabili alle procedure operative, ai flussi di lavoro, all'idoneità del campione ed alla sua congruità con la richiesta. In particolare, utilizzando le eccezioni formali associate ai risultati analitici, ci è stata possibile l'analisi delle non conformità registrate nei vari settori analitici ed in base al tempo che intercorre tra l'attivazione di una richiesta e l'emissione del relativo referto ci è possibile monitorare i tempi di risposta in riferimento a parametri differenziati; settore analitico, reparto, fasce orarie ecc..

### Bibliografia

Turnaround times in the laboratory: a review of the literature

Manor PG. *Clin Lab Sci* 1999 Mar-Apr; 12(2):85-9

## È NECESSARIO MIGLIORARE LA QUALITÀ ESPOSITIVA DEGLI ARTICOLI SCIENTIFICI. LA STIMA DELL'ACCURATEZZA DEGLI STUDI DIAGNOSTICI È CONDIZIONATA DALLA CHIARA DESCRIZIONE DELLA LORO STRUTTURA

Giocoli G.<sup>1</sup>, Asioli S.<sup>2</sup>, Boddi V.<sup>3</sup>, Bonanni P.<sup>4</sup>, Brini M.<sup>5</sup>, Cartabellotta A.<sup>6</sup>, Conti A.A.<sup>7</sup>, Fratini M.<sup>8</sup>, Goglio A.<sup>9</sup>, Moratti A.<sup>10</sup>, Pauri P.<sup>11</sup>, Ricci L.<sup>12</sup>, Trenti T.<sup>13,14</sup>, Urbano P.<sup>15</sup>

<sup>1</sup>GdL EBM AMCLI, Milano; <sup>2</sup>UO Anatomia Patologica, AO SMN, Reggio Emilia; <sup>3</sup>Dip. Sanità Pubblica, Univ. Studi, Firenze; <sup>4</sup>Dip. Sanità Pubblica, Sez. Igiene, Univ. Studi, Firenze; <sup>5</sup>Dip. di Patologia Clinica, AO SMN, Reggio Emilia; <sup>6</sup>Gr. It. Medicina Basata sulle Evidenze (GIMBE); <sup>7</sup>Clin. Medica Generale e Cardiologia, Univ. Studi, Firenze; Centro It. Medicina Basata sulle Prove, Firenze; <sup>8</sup>UO Medicina d'Urgenza, AO Umberto I, Ancona; <sup>9</sup>UO Microbiologia e Virologia, AO Osp. Riuniti, Bergamo; <sup>10</sup>UO Radiologia, Osp. Correggio (RE); <sup>11</sup>UO Virologia, AO Umberto I, Ancona; <sup>12</sup>UO Microbiologia e Virologia, AO SMN, Reggio Emilia; <sup>13</sup>GdS EBM SIBioC, Milano; <sup>14</sup>UO Patologia Clinica, Osp. Pavullo n/F (MO); <sup>15</sup>Dip. Sanità Pubblica, Sez. Microbiologia, Univ. Studi, Firenze.

Specialisti di varie discipline riguardanti la diagnosi clinica, desideriamo promuovere la diffusione in Italia del documento *The STARD Initiative del Gruppo Standards for Reporting Diagnostic Accuracy*, che auspica la totale trasparenza degli studi concernenti l'accuratezza dei test diagnostici (1). In esso si propone di migliorare la qualità strutturale ed espositiva di uno studio con l'ausilio di una *checklist* e di un diagramma di flusso. La descrizione completa e scrupolosa dell'architettura di un'indagine permette infatti al lettore di scoprirne i potenziali vizi strutturali (*bias*) e di valutare se i suoi risultati sono generalizzabili e applicabili nella pratica clinica. **METODI.** La *checklist* è il cuore del documento e serve a controllare punto per punto la stesura di un articolo nelle sue varie sezioni. Essa ha la stessa struttura per tutte le branche dei servizi diagnostici, nell'assunto che il termine test definisce qualsiasi indagine idonea ad ottenere informazioni aggiuntive sullo stato di salute di una persona, sia essa di natura ematochimica, microbiologica, anatomo-patologica, funzionale, semeiotica o di *imaging*. Infatti, benché i relativi studi di accuratezza presentino differenze, queste sono ritenute più di quantità che di qualità. La stima dell'accuratezza è eseguita mediante un confronto tra i risultati del test in studio e uno standard di riferimento e può essere espressa in vari modi: sensibilità e specificità, *likelihood ratio* o come area sottostante una curva ROC. Lo standard di riferimento (*gold standard*) è il miglior metodo disponibile per appurare la presenza o l'assenza della condizione *target* dell'indagine: può essere un metodo, ma anche un insieme di criteri clinici e di laboratorio, o il monitoraggio clinico dei soggetti nel tempo. **RISULTATI.** Con la *checklist* e il diagramma di flusso è facile verificare se il confronto è indipendente e cieco, cioè se tutte le determinazioni sono state eseguite con entrambi i metodi e senza che i rispettivi operatori siano a conoscenza dei rispettivi risultati; il mancato rispetto di questi accorgimenti può produrre un'errata stima dell'accuratezza. Altri fondamentali requisiti di uno studio di valutazione riguardano la chiara descrizione dell'ambiente di reclutamento: la comunità oppure un ospedale generale o universitario. È infatti ben diverso lo spettro clinico dei pazienti di questi diversi luoghi e il medico deve poter verificare se sia paragonabile alla popolazione dei propri assistiti. Il miglior disegno di studio prevede una serie consecutiva di pazienti reclutati quando la malattia è sospetta, non accertata. Questo disegno riproduce le circostanze di applicazione del test nella pratica clinica, su casi lievi o gravi ed anche su persone con disturbi simili, ma di diversa natura. Ciò serve per svizzerare l'aspetto dei falsi positivi. Tale tipo di studio (*osservazionale-transversale*) fornisce valutazioni del potere discriminante di un test e del suo potere predittivo assai più attendibili di quelle basate sul confronto, spesso retrospettivo, tra un gruppo di pazienti con malattia conclamata e un gruppo di volontari "normali". Architettura, quest'ultima, assai diffusa in campo diagnostico (studi caso-controllo) e affetta di frequente dallo *spectrum bias*. **CONCLUSIONI.** Noi richiamiamo l'attenzione sull'eccezionale importanza di questo documento. È probabile che la rapida diffusione di computer e palmari riesca a superare le attuali resistenze dei clinici ad utilizzare i test diagnostici in funzione del potere discriminante e del valore predittivo. Ma resta il fatto che la stima dei parametri pertinenti deve avvenire con procedure il più possibile esenti da vizi strutturali. La loro corretta descrizione appare indispensabile per tutta la comunità scientifica.

IL CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO CQI E INTERNO ALLARGATO CQA BIORAD. UNA VALUTAZIONE AGGIUNTIVA CON EXCEL BASATA SULLA VARIABILITÀ BIOLOGICA

Angelini G#, Romano C.\*

#Laboratorio Analisi Atri (Teramo)

\*Laboratorio Analisi ASL Chieti

La valutazione del controllo di qualità interno (CQI) e del controllo interno allargato (CQA) è certamente fonte di perplessità al momento di prendere decisioni immediate (CQI) o a posteriori (CQA), in quanto esistono diverse strategie per definire i traguardi analitici (TA). Tuttavia il problema di scegliere la strategia migliore, che ha da sempre diviso l'opinione dei laboratoristi, negli ultimi anni è stato ridimensionato, in quanto per la definizione dei TA l'approccio alla variabilità biologica (VB) sembra avere oggi l'approvazione di gruppi di esperti ed appare quello più consistente (1). La valutazione a posteriori, mensile e cumulativo, fornito dalla ditta Biorad si basa esclusivamente su due indici: SDI e CVR che implicano il coinvolgimento di un gruppo di riferimento (Gruppo Omogeneo) per la valutazione delle performance del laboratorio. Scopo del nostro lavoro, sviluppato interamente con Excel, è quello di fornire una valutazione aggiuntiva a quella fornita dalla ditta Biorad utilizzando strategie basate sulla VB (Ricos) per definire le specifiche di qualità di imprecisione (I%), inaccuratezza (B%) ed errore totale (TE%) di 25 costituenti del siero appartenenti ai cosiddetti esami di routine e/o urgenze (Col, glic, urea, uric, trig etc). La cartella di lavoro da noi elaborata è composta da 10 fogli e si basa sulle formule derivate dalla VB proposte da Fraser ed altri, per calcolare i traguardi analitici definiti: desiderabili e minimi. L'utilizzo della cartella avviene in concomitanza del riinvio degli elaborati mensili da parte della Biorad: il foglio denominato "immissione dati" è il solo a permettere l'immissione di 4 parametri per analita (medie e CV del laboratorio e del gruppo omogeneo). In tempo reale nelle successive colonne di valutazione viene automaticamente visualizzata la posizione di ciascun analita rispetto solo ai traguardi "desiderabili" di imprecisione e inaccuratezza (Tabella 1), infatti vengono segnalati con "OK" i valori che rientrano nei limiti di accettabilità e con la ripetizione del dato immesso, i valori che superano i TA. Inoltre l'aspetto cromatico facilita la valutazione delle performance (Verde= accettabile; Rosso= non accettabile).

Il foglio denominato "DC e valutazioni finali" mostra, per i due livelli di controllo, le Differenze Critiche (DCr) ottenute e la posizione dei 25 analiti rispetto sia ai TA desiderabili che ai TA minimi, sempre evidenziando in forma cromatica le performance analitiche. La valutazione tabellare viene integrata con ulteriori 3 fogli (grafici a barre) che alternativamente mostrano le performance di imprecisione, inaccuratezza ed errore totale dei 25 analiti nei due livelli di controllo rispetto ai traguardi analitici desiderabili e minimi. Il foglio "commenti finali", con password differenziata, è a compendio dei precedenti in quanto consente un commento finale da parte del responsabile del Sistema Qualità. L'archiviazione mensile del file permette la consultazione successiva per eventuali confronti in periodi (mesi) di interesse particolare, potendo in questo modo monitorare storicamente l'andamento delle performance del sistema. La cartella di lavoro da noi elaborata è per il momento ristretta a soli 25 analiti, ma è nostra intenzione adattarla ad altri costituenti cui è nota la VB nel caso il lavoro abbia un ulteriore riscontro favorevole. Il nostro lavoro, per dirla alla "Plebani", non vuole essere altro che un piccolo contributo a quella strada della Qualità da percorrere insieme.

Tabella 1

Visualizzazione parziale del foglio "Immissione dati".

ANALITA	Media L1 ottenuto	Media L1 gruppo omogeneo	1% L1 ottenuto	1% L1 gruppo omogeneo	L1 valutazione bias	L1 valutazione imprecisione
Alfa-amilasi	51	51,02	5,7	5	ok	5,70
ALT	39,42	38,21	3,6	5	ok	ok
Albumina	3314	3258	2,5	4	1,72	2,50
Fosfatasi alcalina	75	76,53	2,5	2	ok	ok
AST	29,92	31,1	1,3	2,5	ok	ok
Bilirubina totale	0,54	0,57	9,3	10	ok	ok
Calcio	1,89	1,98	2,8	2,9	-4,55	2,80
Cloruri	101,7	100	1,3	2	1,70	1,30
Colesterolo totale	251,8	252,6	1,5	2	ok	ok
Colinesterasi	2633	2702	1,7	2	ok	ok
Azoto Ureico	14,12	14,62	3	3,5	ok	ok

Bibliografia

- 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. *Biochimica Clinica*, 1992, vol. 16, n 8.

RISULTATI DI UN QUESTIONARIO PROPOSTO DAL LABORATORIO AGLI UTENTI DELLE UNITA' OPERATIVE DELL'AZIENDA

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

Laboratorio Analisi -Azienda Ospedaliera "Umberto I"-Ancona

Con l'obiettivo di migliorare la qualità del servizio offerto e allo scopo di conoscere il grado di soddisfazione degli utenti delle unità operative dell'Azienda, il Laboratorio, ha formulato e proposto un questionario.

*Materiali e metodi* Il questionario era costituito da n.12 domande a risposta multipla o libera. Per ciascuna domanda è stata definita una scala di 3 o 4 livelli di risposta. Nel corso di una delle riunioni periodiche con le caposala sono stati consegnati 600 questionari da distribuire a tutti gli operatori delle Unità Operative. E' stata richiesta una valutazione globale sull'attività del Laboratorio. Sono state fatte domande relative ad aspetti tecnici, come la compilazione della scheda per la richiesta di esami e l'uso dei nuovi presidi per i prelievi, e relative alla efficienza organizzativa riguardo ai tempi di raccolta dei prelievi, ai tempi ed alle modalità di consegna dei referti. E' stata indagata la qualità percepita relativamente alla professionalità e disponibilità degli operatori nei contatti diretti e telefonici. Gli utenti sono stati invitati inoltre a fare osservazioni e dare suggerimenti.

*Risultati* Nell'arco di due mesi dalla consegna, sono rientrati n.152 questionari (25,3%). Hanno risposto n.118 infermieri professionali, n.18 caposala, n.14 medici, n.2 medici specializzandi e n.2 operatori socio sanitari.

L'elaborazione delle risposte ha mostrato che il 50% giudica buono il servizio offerto ed il 52% ritiene che la funzionalità del laboratorio è migliorata nell'ultimo anno. La compilazione della scheda di richiesta esami è stata giudicata molto semplice dal 20% e semplice dal 74%. Il 75% ritiene fattibile l'inserimento delle richieste direttamente in reparto e il 54% ritiene che i referti debbano essere consegnati entro le ore 14.00. La competenza e la preparazione professionale è stata giudicata ottima dal 12% e buona dal 59% mentre la cortesia e disponibilità è stata giudicata ottima dal 39% e buona dal 36%. Il 46% degli utenti ha fatto osservazioni e ha dato suggerimenti; i più hanno lamentato una comunicazione insoddisfacente per informazioni mancate e per modi non sempre cortesi.

*Conclusione* In generale la qualità del servizio offerto è stata valutata positivamente ed è stato evidenziato un miglioramento nel corso dell'ultimo anno. Le innovazioni organizzative sono state accolte positivamente, mentre l'impiego dell'ago protetto non ha trovato largo impiego. Le osservazioni hanno sollecitato momenti di riflessione riguardo alle abitudini comportamentali e stiamo riesaminando il nostro operato con l'occhio critico dell'utente. Questa prima esperienza di monitoraggio della soddisfazione degli utenti ci ha fornito risultati lusinghieri ed elementi su cui lavorare nel nostro cammino verso la qualità.

PLEBANI M, CHIAZZA ML: AUDIT IN LABORATORY MEDICINE. EUR J CLIN CHEM CLIN BIOCHEM, 1996; 34:655-57.

ESPERIENZA DI CERTIFICAZIONE DEL LABORATORIO DI SANITÀ PUBBLICA DELLA ASL DI BRESCIA

Grassi E., Speziani F., Barberis D., Gregorini L.\*

Laboratorio di Sanità Pubblica, via Cantore 20, 25100 Brescia; \* GTQ - Consulenze

Negli ultimi anni è diventato di grande attualità il concetto di qualità totale; dapprima introdotto nell'industria, è ora ampiamente utilizzato anche in ambito sanitario, tanto da avere trovato menzione nella recente legislazione che prevede nella "certificazione-accreditamento" uno dei momenti centrali dell'aziendalizzazione della sanità e della concorrenza pubblico-privato (DL 502/92). Nel panorama della sanità il Laboratorio analisi rappresenta, per molti aspetti, una realtà facilmente assimilabile a un'industria per l'adozione di processi standardizzati che portano a un prodotto facilmente quantificabile e con caratteristiche di qualità misurabili.

Connaturato alla qualità del Servizio è anche il concetto di miglioramento continuo della qualità che deve portare al conseguimento di gradi sempre maggiori di efficienza, di efficacia e, in ultima istanza, di soddisfazione del cliente.

*Scopo* Scopo del presente lavoro è riassumere l'esperienza intrapresa dal Laboratorio di Sanità Pubblica di Brescia nel progetto per la Certificazione, finalizzato alla implementazione, nell'arco di due anni, di un sistema qualità, secondo le norme UNI ISO 9001:2000, in grado di essere applicato a tutte le attività del Servizio. Questo Laboratorio presenta infatti una struttura complessa dal momento che ad esso afferiscono non solo i tradizionali settori di Laboratorio Generale ma anche quelli di Tossicologia/ricerca algale e microbiologia degli ambienti confinati, quello di Microbiologia umana e delle acque e quello Chimico. Metodologia 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 la partecipazione attiva ed il coinvolgimento di tutto il personale del Servizio. La distribuzione degli incentivi previsti dalle norme contrattuali per il personale del comparto e laureato è stata di grande aiuto nel raggiungere il coinvolgimento totale e partecipato di tutto il personale, trasformandolo in un gruppo proteso e motivato al miglioramento del progetto stesso.

*Risultati* Gli obiettivi considerati come strategici nell'ambito del progetto sono i seguenti:

- 1- garanzia della qualità tecnica delle prestazioni erogate dal servizio (Predisposizione di più Procedure Gestionali e Metodiche)
- 2- soddisfazione dei diritti e delle aspettative dell'Utente (instaurazione di un sistema "Customer Satisfaction")
- 3- soddisfazione e sicurezza degli operatori (Procedura relativa alle risorse umane)
- 4- migliore utilizzo delle risorse e quindi disponibilità del prodotto a costi contenuti per il laboratorio e a tariffe competitive. (Procedure relative al monitoraggio dei processi)

*Considerazioni conclusive*

Il sistema qualità scaturito dal progetto ed applicato a tutti i settori del laboratorio è stato completato nell'ambito di tempo previsto ed è stato certificato da Certiquality il 22 aprile 2002.

*Norma Italiana: Sistemi di gestione per la Qualità - Requisiti - UNI EN ISO 9001:2000*

## OBIETTIVI PER L'IMPRECISIONE NEL CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Bonvicini P.<sup>1</sup>, Metus P.<sup>2</sup>, Pavón M.A.<sup>3</sup>, Tocchini M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

<sup>2</sup>Laboratorio di Analisi, Ospedale Civile, Menaggio (Como)

<sup>3</sup>Práctica Profesional. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

<sup>4</sup>Laboratorio di Analisi, Ospedale Torrette, Ancona, Italy

Il modello più consolidato per stabilire gli obiettivi per l'imprecisione è quello che utilizza i dati basati sulla variabilità biologica. Nella sua applicazione pratica vi sono tuttavia alcuni punti "deboli". Tra questi, il fatto che in alcuni casi i limiti derivati sono a volte troppo "stretti" e altre volte troppo "ampi" rispetto allo stato dell'arte delle prestazioni analitiche. Inoltre, i dati sulla variabilità biologica non sono spesso sufficientemente "robusti" con valori in letteratura anche ben diversi. Infine, la stessa scala di applicazione.

Viene proposto un modello basato sulla integrazioni tra i dati della variabilità biologica (con l'impiego di una nuova scala) e lo stato dell'arte (generale) delle prestazioni analitiche.

Il limite minimo per la variabilità analitica (CVa) è stato posto ad un valore pari ai due terzi della variabilità biologica intraindividuale (CVi). In queste condizioni la variabilità complessiva aumenta del 20% e porta al raddoppio della percentuale di valori che esce dall'intervallo. I valori "medio" e "ottimo" sono quelli che portano ad un aumento di valori fuori intervallo pari al 50% e 25% e corrispondono a  $0,45*CVi$  e  $0,32*CVi$ .

I dati così ottenuti sono stati integrati con quelli dello stato dell'arte, cioè la reale situazione delle prestazioni analitiche nei laboratori, confrontandoli con opportuni percentili. Il 10° percentile (P) è il valore di imprecisione analitica ottenuto dal 10% dei laboratori. Il 50° P è quello ottenuto dal 50% dei laboratori e così via. Il confronto tra gli obiettivi calcolati tramite la variabilità biologica e lo stato dell'arte permette di scegliere le condizioni migliori nelle situazioni in cui gli obiettivi appaiono troppo larghi o troppo stretti. Ad esempio, se la variabilità analitica per un costituente è, per molti laboratori, inferiore a quella prevista come obiettivo "ottimo", questa qualifica verrà applicata solo ai laboratori che entrano nei primi 50 percentili e quella di soddisfacente a quelli fino al 75° percentile. Mentre in ogni caso la prestazione sarà considerata soddisfacente se  $CVa = 0,66*CVi$ . Analogamente se la variabilità biologica porta ad un obiettivo "ottimo" inferiore a quello del 10° percentile, verrà scelto come obiettivo il valore del 10° percentile.

Fraser CG, Biological variation: from principles to practice. AACC Press, Washington 2001

## METODOLOGIE APPLICATIVE DI INDICATORI DELLA FASE PREANALITICA

Brescia V., Di Serio F., Lovero R., Varraso L., Pansini N.

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

La possibilità di ottenere un accurato monitoraggio della fase preanalitica permette la rilevazione di aree di miglioramento con il conseguente decremento della percentuale degli "errori" di Laboratorio.

*Scopo* del nostro studio è stato di identificare alcuni indicatori di non conformità della fase preanalitica correlati alla frequenza del flusso di lavoro ed alla tipologia delle Unità Operative (U.O.) al fine di consentire processi operativi di miglioramento del Servizio.

*Metodologie:* il LIS è stato implementato al fine di poter ottenere dati statistici inerenti gli indicatori di non conformità preanalitica (fase accettazione) e sui flussi di lavoro in rapporto alle singole U.O.

*Risultati:*

Riepilogo pratiche inviate ( Gennaio 2001)

	UTIC	Cardio Ch. (CCH)	Gastroent (GAST)	Ginecolog. (GIN.I)
Routine	319	141	455	199
Emerg.	940	848	238	426
Totale	1259	989	693	625

Tabella frequenza indicatori

	Unità Operative			
	UTIC	CCH	GAST	GIN.I
Camp. senza richiesta	0	0	3	1
Camp. non idonei	1	1	3	0
Camp. Barcode non confor.	0	0	1	5
Camp.con barcode illeggib.	3	0	1	0
Camp. non consegnati	10	0	0	7
Camp.di siero insufficiente	0	5	7	1
Camp. trasporto non idoneo	0	0	0	1
Camp. non consegnati	0	9	0	0
Camp.Ves coagulati	16	0	9	2
Camp. Coagulazione con proporzioni non rispettate	4	1	5	13

*Conclusioni:* i dati ottenuti hanno consentito di fornire una migliore informazione alle U.O. sull'importanza delle procedure preanalitiche in termini di efficacia ed efficienza. Inoltre hanno permesso di migliorare nel Laboratorio alcuni processi operativi inerenti la fase di accettazione in riferimento a specifiche esigenze cliniche.

Il nostri dati, pertanto, evidenziano la necessità di una stretta integrazione e conoscenza delle esigenze Cliniche e di Laboratorio enfatizzando l'attenzione sui processi della fase preanalitica.

FASE PREANALITICA: VALUTAZIONE DELLA INTERFERENZA DA EMOLISI, IPERBILIRUBINEMIA E TORBIDITÀ. ESPERIENZA DELLA GESTIONE AUTOMATICA DEI SERUM INDEX DA PARTE DEL SISTEMA GESTIONALE INTERNO

Rettondini M., Trevisan M. T.

U.O. Laboratorio analisi – Azienda ULSS 20 Verona

L'interferenza da emolisi, ittero e torbidità in Chimica Clinica viene valutata nel nostro laboratorio preliminarmente da un'ispezione visiva del campione e successivamente mediante la determinazione dei Serum Index su strumentazione Hitachi (Modular PP – H917 – H912), per cercare di oggettivare nel miglior modo possibile la valutazione e la eventuale azione correttiva.

Sono state preparate 3 tabelle (indice H, I e L) che consigliano le azioni correttive in relazioni ad intervalli predefiniti di Serum Index per i principali analiti di Chimica Clinica.

Soprattutto in situazioni di emergenza o in presenza di personale non adeguatamente istruito, ci è parso utile affidare l'applicazione automatica delle azioni correttive suggerite dal valore di Serum Index al nostro sistema gestionale interno (LIS della ditta Bayer) il quale traduce le tabelle esercitando l'azione correttiva necessaria, che può andare dall'apposizione di una nota di commento accanto al dato, alla soppressione di alcuni risultati fino ad un giudizio di non idoneità del campione, con necessità di dover richiedere un altro prelievo.

La procedura è applicata attraverso alcuni algoritmi dedicati a seconda del test, dell'interferente e del grado di interferenza: l'automatismo, prima della validazione finale precedente all'inoltro del referto, viene sempre supervisionato dall'operatore responsabile in turno.

Nella nostra esperienza vengono presentati gli algoritmi utilizzati che traducono le tabelle e mostriamo alcuni esempi di referto esplicitandone tutti i passi effettuati dall'accettazione del prelievo fino alla refertazione.

“NUOVE” EMOGLOBINOPATIE NELLA POPOLAZIONE ITALIANA: L'Hb OULED RABAH

Mangione M., Scimè-Degani V., Restagno G., Leone L., Collell M., Sanseverino P., Sbaiz L., Leone D.<sup>1</sup>, Parodi M.I.<sup>1</sup>, Baffico M.<sup>1</sup>, Baldi M.<sup>1</sup>, Ivaldi G.<sup>1</sup>.

S.C. Genetica Molecolare. Laboratorio Analisi. AO OIRM-S. Anna. Piazza Polonia 94, 10126 Torino.

(1) Laboratorio di Genetica Umana-Microcitemia, Ospedali Galliera, Via A. Volta 10, 16128 Genova.

Negli ultimi anni abbiamo esaminato in numero crescente immigrati, soprattutto coppie in gravidanza integrate nella nostra popolazione, provenienti da diversi Paesi e Continenti (Europa dell'Est, Africa, Medio ed Estremo Oriente, Sud America). Abbiamo potuto osservare diversi difetti dell'emoglobina (Hb) (varianti Hb e talassemie), molti di questi sono risultati “nuovi” rispetto a quelli noti nella nostra popolazione; ciò ha richiesto un approccio diagnostico adeguato soprattutto per definire i possibili rischi nel caso in cui si venissero a produrre composti emoglobinici non conosciuti.

In particolare abbiamo osservato 5 donne in gravidanza, non imparentate tra loro e un uomo, partner e zio di una di esse: 4 provenienti dal Marocco e 2 dall'Algeria sono risultati portatori della variante delle catene  $\beta$  globiniche denominata Hb D Ouled Rabah.

Lo screening per emoglobinopatie, eseguito all'inizio della gravidanza in tutti i casi, ha mostrato la presenza di una variante che in HPLC dedicato coeluisce con l'Hb A<sub>2</sub> non consentendo la corretta valutazione di quest'ultima, i parametri emocromocitometrici erano nella norma, mentre la separazione delle catene globiniche, mostrava la presenza di  $\beta$  catene anomale più idrofiliche delle catene  $\beta$  normali. I test di stabilità dell'Hb erano negativi. Si è quindi reso necessario in ogni caso l'analisi della sequenza nucleotidica del gene  $\beta$  che ha mostrato la presenza di una mutazione C→A al nucleotide 110 corrispondente alla sostituzione Asn→Lys al codone 19 delle catene  $\beta$ . Tale variante emoglobinica era stata descritta in precedenza in soggetti originari del Nord Africa e denominata appunto Hb D Ouled Rabah.

Molti degli immigrati recenti provengono da zone dove è alta l'incidenza di difetti Hb e spesso risultano diversi da quelli noti nella popolazione italiana: il mescolamento etnico può portare alla produzione di composti emoglobinici con fenotipi clinici non facilmente prevedibili per cui una opportuna consulenza genetica non può prescindere da una completa caratterizzazione dei difetti Hb coinvolti. Nei casi da noi osservati risultava particolarmente importante escludere la presenza di Hb S nei rispettivi partners, vista l'alta incidenza di tale mutazione nelle loro zone di origine, e in considerazione della significatività clinica dell'eventuale composto Hb derivante.

Elion J., Belkhdja O., Wajcman H., Labie D.: *Biochim.Biophys.Acta*, 310:360,1973.

## EMOCROMO POST-DONAZIONE DI SANGUE: VALUTAZIONE DELLA SIGNIFICATIVITÀ, COMUNICAZIONE DATI PRELIMINARI

Volpones G, Giommi M., Veneziano F.A., Boetti L., Vandi M., Malavasi C., Mussoni M.P., Burnazzi R., Ghinelli U., Magnani L., Vandi W., Ciavatta M.

Dipartimento di Patologia Clinica - Laboratorio di Analisi, Servizio Trasfusionale – AUSL Rimini

**Premessa:** le recenti disposizioni di legge (DM 26/01/01) hanno imposto la necessità di eseguire su tutte le unità donate la determinazione dell'emogramma. Poiché nella nostra attività quotidiana la raccolta dei campioni avviene al termine della donazione, abbiamo voluto valutare se tale pratica fosse da ritenersi corretta oppure da abbandonare o infine meritevole di opportuni aggiustamenti.

**Metodi:** lo studio è stato condotto presso il Punto di Raccolta di Rimini nell'arco di 6 mesi di attività e ha previsto l'esame di n° 450 campioni di sangue da donatori (360 maschi e 90 femmine) di età compresa nei range di legge; per ogni donazione è stato considerato il rapporto quantità di sangue donato/volume ematico totale quale eventuale fattore correttivo. I campioni sono stati prelevati prima e dopo la donazione, utilizzando sedi diverse per la venipuntura. I parametri presi in considerazione fra quelli previsti nell'esame emocromocitometrico sono stati: emoglobina (anche capillare), ematocrito e numero totale globuli bianchi, globuli rossi, piastrine. I dati ottenuti sono stati analizzati attraverso un apposito software statistico utilizzando come test di riferimento il "T Student Paired".

**Risultati:** i dati finora raccolti hanno evidenziato differenze significative, in modo particolare per i globuli bianchi e l'emoglobina; di quest'ultima sono stati osservati ulteriori significativi scostamenti fra la determinazione capillare e l'emocromo pre-donazione. Gli autori propongono fattori di correzione supportati dalla analisi di distribuzione che meglio verrà precisata nella pubblicazione in poster.

## SYSMEX XE-2100: INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEI RETICOLOCITI E DEI PARAMETRI RETICOLOCITARI

Mercurio S., Fanelli A., Del Genovese A., Rossetti M., Balboni F., Sastrucci S., Iordache L., Messeri G.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze, Italia

Il Sysmex XE-2100 è un contaglobuli in grado di eseguire il conteggio automatico dei reticolociti e delle sottopopolazioni reticolocitarie mediante l'utilizzo di un colorante fluorescente polimetinico e rivelazione con laser a diodi. Inoltre, nel canale dei reticolociti, lo strumento è in grado di determinare due parametri, RBC-Y e RET-Y, che sembrano correlare con la percentuale di globuli rossi ipocromici e con il contenuto emoglobinico reticolocitario, rispettivamente. Poiché gli strumenti disponibili in commercio si basano su principi diversi, è essenziale che ogni laboratorio calcoli i propri intervalli di riferimento.

Lo scopo del lavoro è l'individuazione degli intervalli di riferimento dei reticolociti e degli indici reticolocitari impiegando l'analizzatore XE-2100. Abbiamo analizzato 190 campioni di donatori di sangue considerati normali in base ai criteri NCCLS di cui 50 femmine e 140 maschi, di età compresa fra i 20 e i 50 anni. I risultati sono mostrati nelle tabelle.

### tutti i soggetti

	Media	Mediana	DS	range 95°le
Ret%	0,94	0,91	0,30	0,51-1,67
Ret#	0,04	0,04	0,01	0,04-0,09
LRF%	92,00	92,40	3,45	82,4-99,6
MRF%	7,40	7,10	3,13	5,1-17,6
HRF%	0,60	0,50	0,49	0,5-2,6
RBC-Y	1770,1	1776,0	55,1	1726-1878
RET-Y	1885,3	1894,0	61,3	1894-2016

### maschi

	Media	Mediana	DS	range 95°le
Ret%	0,93	0,92	0,26	0,52-1,64
Ret#	0,05	0,04	0,01	0,04-0,09
LRF%	91,95	92,60	3,58	82,6-99,6
MRF%	7,48	7,00	3,23	5,0-17,6
HRF%	0,57	0,50	0,50	0,5-2,6
RBC-Y	1763,0	1776,0	57,1	1720-1878
RET-Y	1868,0	1895,0	68,1	1805-2013

### femmine

	Media	Mediana	DS	range 95°le
Ret%	0,93	0,89	0,29	0,59-1,67
Ret#	0,04	0,04	0,01	0,03-0,07
LRF%	92,03	92,40	3,01	82,4-97,8
MRF%	7,55	7,30	2,79	5,3-17,0
HRF%	0,51	0,40	0,43	0,4-1,9
RBC-Y	1772,0	1777,0	50,1	1727-1866
RET-Y	1891,0	1887,0	53,1	1807-2016

I dati raccolti confermano la necessità che ogni laboratorio provveda a calcolare i propri intervalli di riferimento. Non si rilevano differenze fra maschi e femmine.

## SPETTROMETRIA DI MASSA E SEQUENZIAMENTO GENICO NELLA CARATTERIZZAZIONE DI UNA Hb VARIANTE

<sup>1</sup>Galli G., <sup>1</sup>Caruso D., <sup>1</sup>Crestani M., <sup>1</sup>Da Riva L., <sup>1</sup>Giavarini F., <sup>1</sup>Mitro N., <sup>2</sup>Mozzi R., <sup>2</sup>Franzini C.

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Via Balzaretti 9, 20133 Milano.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche L.Sacco, Università degli Studi di Milano, Via G.B. Grassi 74, 20157 Milano.

La variante J-Oxford, conosciuta anche con il nome di I-Interlaken, fu descritta per la prima volta in Inghilterra nel 1964 da Liddell durante una studio epidemiologico sulla popolazione di Oxford e Pietroburgo (Liddell et al., Nature 4955, 269, 1964).

Vengono di seguito descritte le procedure analitiche utilizzate per la caratterizzazione di tale variante, in una famiglia di origine sarda, inizialmente evidenziata mediante elettroforesi e HPLC.

L'analisi LC-MS delle catene in toto ha rilevato preliminarmente la presenza di una mutazione a carico della catena  $\alpha$ , che comportava una variazione di massa molecolare di 58 unità. Nel tracciato LC-MS del digerito triptico della catena  $\alpha$ , si individuava un peptide anomalo riconducibile alla sequenza  $\alpha$ 12-31 mutata. Il sequenziamento di tale peptide ottenuto mediante LC-MS/MS suggeriva una mutazione a carico di uno dei due aminoacidi in posizione  $\alpha$ 15 o  $\alpha$ 16. Per l'identificazione puntuale della mutazione, si è ricorso quindi al sequenziamento genico con metodo di Sanger. La determinazione della sequenza nucleotidica ha individuato definitivamente la stessa mutazione nel gene globinico  $\alpha_1$  della paziente e della madre, mentre il padre risultava non portatore. Tale mutazione, [ $\alpha_1$ -15(A13)-Gly  $\rightarrow$  Asp], caratteristica della variante J-Oxford, impedisce il taglio proteolitico a livello della Lys in posizione 16, rendendo ragione del peptide anomalo individuato.

In conclusione, viene riportato un caso di una variante di emoglobina in cui il solo apporto della spettrometria di massa per lo studio della sequenza amminoacidica non è stato conclusivo. Tale tecnica è stata comunque altamente efficace per identificare la catena mutata e per delimitare la regione coinvolta nella mutazione rendendo più agevole da un punto di vista tecnico, disegnare il *primer* di sequenziamento opportuno per procedere all'amplificazione selettiva dei due geni codificanti la catena  $\alpha$ .

## EMOCROMATOSI EREDITARIA E TALASSEMIA: ESPERIENZE DI SCREENING ASSOCIATO

Ivaldi G., Leone D., Parodi M.I., Pascotto D., Mori M.<sup>1</sup>, Lavagetto A.<sup>2</sup>, Forni G.L.<sup>2</sup>

Lab. di Genetica Umana, Set. Microcitemia, (1)Lab. Analisi, (2)Centro Microcitemia, Ospedali Galliera, GE.

L'emocromatosi ereditaria, la malattia auto-somica recessiva più diffusa nelle popolazioni caucasiche, è caratterizzata da un progressivo accumulo di ferro nell'organismo. Si conoscono diverse forme di emocromatosi, la più diffusa, il cui gene responsabile (HFE) è stato localizzato e identificato sul cromosoma 6, è stata associata alla presenza di due mutazioni missense la C282Y e l'H63D. Lo stato omozigote di queste due mutazioni (prevalentemente la prima), o la presenza in doppia eterozigosi, si ritiene correlato con la malattia. Se non diagnosticata e trattata in tempo tale condizione può condurre a gravi danni a carico di vari organi. La talassemia rappresenta un'altra malattia autosomica recessiva ad elevata diffusione soprattutto in alcune aree geografiche e in determinate popolazioni. In Liguria, dove circa il 50% dei residenti ha origini da regioni ad elevata incidenza di difetti dell'Hb, lo screening preventivo per la talassemia viene attuato secondo criteri di opportunità in bambini, in coppie in gravidanza o in epoca preconcezionale e in soggetti con "anemie" non altrimenti definite.

Considerando che un corretto protocollo di screening per la talassemia richiede comunque una opportuna valutazione del carico marziale, e che uno screening di massa "dedicato" all'emocromatosi può risultare non sufficientemente motivato, stimato vantaggioso il rapporto costo-beneficio, abbiamo ritenuto di procedere ad uno screening associato. Negli ultimi 18 mesi abbiamo così potuto esaminare 3982 soggetti per i quali oltre ai test relativi alle emoglobinopatie è stato eseguito uno screening fenotipico per eventuale sovraccarico di ferro mediante la valutazione della saturazione della transferrina. In tutti i casi è stata eseguita una anamnesi soggettiva e familiare utile all'interpretazione dei risultati. Si è così individuata una sottopopolazione di soggetti (132) con valori della saturazione della transferrina (> 45%), confermata anche con la ferritinemia, tale da giustificare uno screening genotipico secondo i criteri suggeriti dalla EASL(1) mediante ricerca delle mutazioni C282Y e H63D e in alcuni casi anche di altre mutazioni note più rare. I soggetti così esaminati hanno presentato una frequenza della mutazione C282Y del 5.5% in omozigosi e del 10% in eterozigosi; mentre l'H63D è risultata presente nel 4.4% dei casi allo stato omozigote e nel 35% in quello eterozigote. Nell'1.1% le due mutazioni sono risultate associate in doppia eterozigosi.

Riteniamo che un tale approccio possa contribuire ad una efficace diagnosi dell'emocromatosi ereditaria in una fase pre-sintomatica con un modesto incremento dell'impegno economico.

(1) EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. J Hepatol, 2000; 33:485-504.

## SISTEMA AUTOMATIZZATO TEST-1: CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DELLA VES

Napoli P., Montaruli B., Plateroti S., Martini A., Sacchi A., Toja A., Saitta M.

Laboratorio Analisi, CIOV – Ospedale Evangelico Valdese, Torino

Il test sulla velocità di eritrosedimentazione (VES) è considerata un'analisi utile sia per la determinazione di una risposta infiammatoria di fase acuta, sia di processi cronici e per monitorare collagenopatie, malattie reumatiche. Il metodo di riferimento ICSH comporta per l'operatore un elevato rischio biologico in quanto utilizza provette aperte e risulta troppo indaginoso per l'utilizzo nella pratica clinica. Per questo motivo sono stati introdotti sul mercato alcuni sistemi automatizzati che utilizzano provette chiuse, fra questi vi è anche il sistema TEST-1 (SIRE Analytical System, Udine, Italy), analizzatore completamente automatizzato che utilizza la tecnologia della fometria capillare per la determinazione della VES, strumento attualmente in uso presso il nostro laboratorio. Questo sistema, purtroppo, presenta alcune difficoltà nel misurare campioni stabilizzati da usare come controllo interno di qualità (CQI). È stato riportato in letteratura come campioni conservati per 24 ore abbiano valori di VES più bassi rispetto al valore iniziale (diminuiti di circa il 10%). Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare se la diminuzione dei valori di VES (bias) misurati 24 ore dopo il tempo zero è sufficientemente stabile da consentirne l'utilizzo come CQI. Abbiamo valutato: i valori di VES ottenuti in 200 campioni di sangue venoso ed analizzati con l'analizzatore TEST-1; la stabilità nel tempo mediante analisi della significatività della differenza fra le medie misurate al tempo zero e dopo 24 ore utilizzando lo strumento TEST-1; la VES ogni giorno per circa 1 mese in 2 campioni con valori di circa 15 mm/h (13-17) e 50 mm/h (47-53) misurati entro 4 ore dal prelievo, conservati per 24 ore a 4°C e misurati il giorno dopo come fossero due CQI. La conservazione dei campioni a 4°C per 24 ore ha causato una significativa diminuzione dei valori di VES ottenuti con il sistema TEST-1 (differenza media = 4.07 mm/h, 95% IC da 3,04 a 5,11;  $p < 0,0001$ ). Il bias causato dalla conservazione a 4°C per 24 ore per i 2 campioni utilizzati come CQI con valori di VES di circa 15 e 50 mm/h è risultato, rispettivamente, pari a 3,6 (95% IC, 2,78-4,52) e 7,83 (95% IC, 5,77-9,88). I limiti di concordanza per i due livelli di controllo sono invece risultati pari a -0,83 e 8,14 per i valori di VES di circa 15 mm/h e 2,78-18,38 per i valori di VES di circa 50 mm/h. Il CQI della VES basato sulla valutazione di due livelli di controllo, basso (di circa 15 mm/h) e alto (di circa 50 mm/h), eseguiti su due campioni valutati entro 4 ore dal prelievo e ripetuti il giorno successivo (24 ore) dopo conservazione a 4°C, sembra essere un metodo valido per monitorare l'accuratezza della seduta analitica e quindi eseguire un CQI sullo strumento TEST-1.

## RISCONTRO DI EMOGLOBINA LEPORE CON TOSOH A1c2.2 GLYCOHEMOGLOBIN ANALYSER

Signori D., Turrin M., Vergerio A.<sup>^</sup>, Saponaro A.\*

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia,  
<sup>^</sup>Divisione di Pediatria-Neonatologia,

\*Medico di Medicina Generale - ULSS 2-Feltre (BL)

*Introduzione:* emoglobina Lepore (Hb Lepore) è il risultato di un crossing over ineguale dei due cromosomi 11, che porta a fusione dei geni delta e beta, con perdita di materiale genico. Lo stato omozigote dà una malattia variabile: dal quadro della talassemia maior all'intermedia. Gli eterozigoti presentano le caratteristiche della talassemia minima. Questa emoglobina strutturalmente anomala è facilmente individuata mediante tecniche elettroforetiche e cromatografiche (1). Lo strumento automatico HPLC Tosoh A1c2.2 Glycohemoglobin Analyser (A1c2.2) per l'emoglobina glicata può essere utilizzato anche per la determinazione dell'assetto emoglobinico, consentendo una agevole quantificazione di HbA2 e HbF e la rilevazione di Hb patologiche (HbS, HbD, HbC).

*Scopo del lavoro:* indicare le modalità di individuazione di Hb Lepore mediante A1c2.2.

*Materiali e Metodi:* l'assetto emoglobinico è stato eseguito utilizzando campioni di sangue venoso in K<sub>3</sub>EDTA, raccolti a digiuno, conservati a 2-8°C e analizzati entro sette giorni; l'analisi è stata eseguita con separazione cromatografica mediante colonna dedicata TSK gel  $\beta$ -thalassemia Hsi con A1c2.2 (Eurogenetics) e con separazione elettroforetica su gel d'agarosio in tampone alcalino e acido (Paragon - Beckman-Coulter).

*Risultati:* Hb Lepore può essere sospettata per la presenza nel cromatogramma di una banda o una doppia banda in A2, con valore superiore 7%. La conferma si ottiene mediante separazione elettroforetica su gel d'agarosio. In ambiente alcalino si dimostra una banda che migra nella posizione di HbS, non confermata in ambiente acido, e con assenza del fenomeno di falcizzazione.

Hb Lepore, eterozigote con HbA, è stata riscontrata in sei membri di una famiglia, appartenenti a tre generazioni, in cui il tratto patologico è stato trasmesso dalla nonna, nata da padre italiano e madre serba, e in un soggetto isolato in cui non è stata studiata la famiglia. Tutti i soggetti, asintomatici, presentavano modesta anemia microcitica, e valori di HbLepore dal 5 al 10%.

*Conclusioni:* A1c2.2 consente un'accurata determinazione di HbA2 e HbF e l'evidenziazione di alcune Hb patologiche. L'attenta osservazione dei cromatogrammi per l'individuazione di anomalie, consente il riscontro di Hb patologiche non identificate direttamente dallo strumento.

### Bibliografia:

1. Roper P, Gonzalez FA, Sanchez J, Anguita E, Asenjo S, Del Arco A, Murga MJ, Ramos R, Fernandez C, Villegas A. Identification of the Hb Lepore phenotype by HPLC. Haematologica 1999; 84(12): 1081-4.