

EMOGLOBINE PATOLOGICHE E SOCIETÀ MULTIETNICA

Terreni A., Brogi M., Mercurio S., Bruschetti A., Gallai R., Ognibene A., Caldini A., Malesci P., Piazza E.

Laboratorio Centrale di Analisi Biochimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

Le variazioni nella composizione della società, dovute all'aumento della numerosità delle singole etnie, una volta poco rappresentate, comportano necessariamente una revisione delle distribuzioni di alcune patologie. Le emoglobine patologiche risultano essere un parametro molto influenzato dalla composizione etnica della popolazione.

Abbiamo condotto un'indagine statistica estrapolando dal nostro database le emoglobine degli ultimi due anni per verificare l'influenza apportata da soggetti stranieri sui risultati.

Il dosaggio quantitativo delle frazioni A₂ e Fetale e la separazione qualitativa delle emoglobine varianti, sono stati eseguiti mediante HPLC (Variant II BIO-RAD Dual Kit Program) utilizzando il programma β-thal.

I dati ottenuti da 1857 soggetti (1107 femmine, 750 maschi) sono stati suddivisi per anno e per sesso e i risultati sono riportati nella tabella seguente:

Anno	Sesso	Totali	Normali	# Soggetti con Emoglobinopatie	%
2000	F	556 (58)	460 (47)	96(11)	17.2 (18.9)
	M	370 (23)	295 (18)	75(5)	20.2 (21.7)
2001	F	551 (61)	418 (44)	133(17)	24.1 (27.9)
	M	380 (28)	284 (17)	96 (11)	25.2 (39.3)

Tra le parentesi il # dei soggetti stranieri

Questo studio evidenzia una maggiore incidenza di soggetti portatori di emoglobine patologiche nell'anno 2001 rispetto al 2000; questa crescita inoltre è maggiormente evidenziabile negli individui con emoglobine patologiche di nazionalità non italiana.

L'analisi delle Hb anomale mostra inoltre una tendenza all'aumento della frequenza di varianti emoglobiniche meno usuali, come varianti δ, Hb H, Hb Lepore e anche di varianti non identificabili con la sola analisi in HPLC.

La trasformazione in senso multi-etnico della società e il conseguente aumento di emoglobine patologiche di difficile identificazione con la sola indagine in HPLC, rende necessaria la creazione di database consultabili in web per confrontare cromatogrammi di forme emoglobiniche rare identificate in laboratori specializzati.

ALTERAZIONI DELLE PROTEINE DI MEMBRANA IN CASI DI β-BETA TALASSEMIA ETEROZIGOTE CON FENOTIPO DI TALASSEMIA INTERMEDIA

Caprari P.¹, Tarzia A.¹, Caforio M.P.¹, Cappabianca M.P.², Cianciulli P.³, Sorrentino F.³, Bianco I.², Salvati A.M.¹

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità; ²Centro di Studi per la microcitemia di Roma; ³Day Hospital Talassemici, Ospedale S. Eugenio, Roma

Obiettivo: Lo scopo del lavoro era individuare le cause di emolisi in pazienti eterozigoti per la β-talassemia con fenotipo clinico di talassemia intermedia.

Metodi: Sono stati studiati 18 pazienti (9 F, 9 M) e per 10 di essi anche il nucleo familiare; come controlli sono stati utilizzati 5 soggetti con talassemia intermedia associata a doppia eterozigosi del gene β. Lo studio comprendeva: la determinazione dei parametri ematologici e biochimici di base per le anemie emolitiche, l'identificazione dei difetti globinici con i metodi convenzionali di analisi genica, l'analisi elettroforetica delle proteine della membrana eritrocitaria e dell'estratto di spettina in SDS-PAGE e la valutazione dell'equilibrio di associazione dimeri-tetrameri della spettina in elettroforesi non denaturante in gel di agarosio.

Risultati: Nei pazienti si confermava il quadro ematologico e biochimico caratteristico di β-talassemia intermedia con alterazioni morfologiche, reticolocitosi, aumento del Hb A₂, del Hb F e delle attività enzimatiche eritrocitarie. L'analisi dei geni globinici evidenziava in tutti i casi la presenza di eterozigosi per un solo difetto β-globinico: β³⁹ in 11 casi, IVS I (nt 1) in 3 casi, mutazioni varie negli altri 5 casi. L'analisi elettroforetica delle proteine di membrana metteva in evidenza alterazioni della spettina in 11 casi (diminuzione in 6 casi, una banda aggiuntiva a peso molecolare più basso in 5 casi), un difetto di proteina 4.2 in 4 casi, un quadro normale in 3 casi. I dimeri di spettina erano aumentati in 13 casi. Nei controlli portatori di β-talassemia intermedia non si osservavano alterazioni della spettina ma soltanto una lieve diminuzione della proteina banda 3 ed un aumento dei dimeri di spettina. Lo studio dei nuclei familiari metteva in evidenza in tutti i casi la presenza di anomalie delle proteine di membrana caratteristiche di sferocitosi (HS) o ellissocitosi (HE) ereditaria che indicavano la presenza di un ulteriore difetto genetico. I dati suggerivano pertanto l'esistenza nei pazienti studiati di un difetto genetico della membrana eritrocitaria combinato con il tratto β-talassemico (1).

Conclusioni: L'associazione del tratto β-talassemico con HS o HE può aggravare l'emolisi e indurre un fenotipo di talassemia intermedia.

1. Maehara T, et al. . Br. J. Haematol. 2002, 117:193.

Hb KIBADAN: UNARARA VARIANTE DELLE CATENE β GLOBINICHE ASSOCIATA A β TALASSEMIA "SILENTE"

Ivaldi G., Leone D., Parodi M.I., Pascotto D., Baffico M., Baldi M., Albertazzi L.¹, Bellesia E.¹, Brini M.¹

Laboratorio di Genetica Umana, Ospedali Galliera, GE, (1) Lab. Analisi, Arcispedale S. Maria Nuova, RE.

Nel corso di esami di screening per la talassemia ed altre emoglobinopatie è stato esaminato un bambino di 8 anni che presentava una modesta microcitosi (MCV 79 fl) con un assetto del ferro normale, un dosaggio dell'Hb A₂ aumentata (4.1%) e la presenza di una variante, pari al 43.5%, che in HPLC "dedicato" (VARIANT™II β Thal Short Program Bio-Rad) veniva eluita prima dell'A₀.

L'elettroforesi a pH alcalino mostrava una frazione Hb "veloce". L'analisi molecolare del DNA, estratto da leucociti del sangue periferico, eseguita per la ricerca dei più comuni difetti β talassemici ha dato esito negativo. Supponendo in base alla percentuale della variante che fossero interessate le catene β , si è proceduto all'analisi dell'intera sequenza nucleotidica del gene β dal nt -208 al nt +585 e dal nt 1175 al nt +1590.

Si sono così potute evidenziare due mutazioni: nel promoter del gene, al nt -101, la mutazione C→T e nel 2° esone, al nt +320, la mutazione G→A. La prima mutazione si riferisce ad un difetto β talassemico noto, piuttosto raro classificato come "silente" per la presenza di parametri emocitometrici pressochè nella norma. Questa mutazione associata a difetti "classici" β talassemici è nota per produrre quadri intermedi lievi. La seconda mutazione evidenziata dall'analisi della sequenza nucleotidica si riferisce invece ad una rara variante Hb descritta in precedenza in altre due famiglie, una africana e una italiana non imparentata con il propositus, in cui un residuo di glicina è sostituito da uno di acido glutamico al codone 46 (β 46 Gly→Glu), tale variante è denominata K Ibadan.

E' stato possibile esaminare anche la nonna del propositus: presentava la variante K Ibadan (37.5%), non microcitosi (MCV 88.7fl) ed era assente la mutazione -101.

Tali risultati ci consentono alcune considerazioni:

- La variante K Ibadan non risulta instabile, le catene β^K mostrano una modesta riduzione dell'affinità per le catene α rispetto alle β^A (37.5% nel soggetto solo eterozigote per la variante);
- La presenza del trait β talassemico associato produce un lieve incremento della variante (43.5%), segno che il deficit di catene β^A , dovuto alla mutazione -101, risulta comunque poco rilevante;
- L'osservazione di questa rara doppia eterozigosi, consente di valutare in circa il 15% la riduzione della sintesi di catene β normali e di confermare "l'innocenza" del difetto -101, anche per i casi in cui tale mutazione dovesse risultare associata ad un difetto β talassemico marcato.

SENSIBILITÀ DEI SAGGI ENZIMATICI PER L'INDIVIDUAZIONE DI ETEROZIGOTI CON G6PD MEDITERRANEA E G6PD SEATTLE

¹Caprari P., ¹Caforio M.P., ¹Maffi D., ¹Pasquino M.T., ²Cianciulli P., ³Lewis S.M., ⁴Vives Corrons J.L., ⁵Miwa S., ¹Salvati A.M.

¹Istituto Superiore di Sanità, ²Ospedale S.Eugenio, Roma, ³Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London, ⁴Hospital Clinic i Provincial, University of Barcellona, ⁵Okinaka Memorial Institute for Medical Research, Tokyo.

Obiettivi. Valutazione della sensibilità diagnostica dei seguenti test enzimatici per le portatrici eterozigoti delle mutazioni G6PD Mediterranea e G6PD Seattle: i) saggio della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) eritrocitaria corretto per la 6-fosfogluconato-deidrogenasi (G6PD-6PGD) e non corretto, ii) determinazione dei rapporti (G6PD-6PGD)/6PGD e (G6PD-6PGD)/piruvatochinasi (PK).

Metodologia. Sono stati esaminati 124 pazienti distribuiti nelle seguenti classi: i) 18 controlli normali M; ii) 30 M emizigoti; iii) 30 F eterozigoti, iv) 8 F omozigoti con G6PD Mediterranea, v) 19 M emizigoti; vi) 7 F eterozigoti con G6PD Seattle; vii) 12 F eterozigoti con G6PD Mediterranea o G6PD Seattle combinate con il tratto β - talassemico. Per i dosaggi della G6PD, della 6PGD e della PK eritrocitarie sono stati impiegati i metodi spettrofotometrici raccomandati dall'International Council for Standardization in Haematology.¹ Le mutazioni specifiche sono state identificate con l'analisi convenzionale dei pattern di restrizione su DNA amplificato mediante PCR.

Risultati. Il saggio della G6PD senza correzione per la 6PGD dimostra una sensibilità del 100% per i M carenti e per le femmine omozigoti indipendentemente dal tipo di mutazione presente. Nei casi di eterozigosi invece la sensibilità è 85% per la G6PD Seattle e 70% per la G6PD Mediterranea. Utilizzando i valori G6PD-6PGD la sensibilità per la mutazione Mediterranea resta invariata, mentre arriva al 100% per la mutazione Seattle. Infine i rapporti (G6PD-6PGD)/6PGD e (G6PD-6PGD)/PK, rispetto ai valori di G6PD-6PGD, non sembrano dare alcun vantaggio diagnostico, fatta eccezione per i casi di combinazione del deficit di G6PD con la β - talassemia eterozigote.

Conclusioni. Questo studio mette in evidenza l'utilità del saggio della G6PD corretto per la 6PGD, per l'individuazione degli eterozigoti con la mutazione Seattle. I rapporti (G6PD-6PGD)/PK e (G6PD-6PGD)/6PGD presentano invece una maggiore sensibilità per la diagnosi di eterozigoti con deficit di G6PD combinato con il tratto β - talassemico.

I. Beutler E, et al. Br.J Haemat 1977,35:331-334

L'EMOCROMO E LA VALIDAZIONE BIOLOGICA DEL SANGUE

Calosso L., Facco G., Albin L., Valle L., Zilli T., Massaro A.L.

INTRODUZIONE: Il D.M. 26.01.01 prevede l'esecuzione dell'emocromo (EM) per la validazione biologica delle unità di sangue, ma non specifica di quali parametri tenere conto. L'EM è un esame multiparametrico di complessa interpretazione. Nel nostro SIT la sorveglianza ematologica nei confronti della salute del donatore è stata impiegata anche per la validazione biologica dell'unità a partire dal 1998. Questo studio sintetizza i risultati e le problematiche.

METODI: Il prelievo viene eseguito al termine della raccolta di sangue intero o dell'afèresi in provette Vacutainer con K₃ EDTA. I campioni vengono analizzati entro sei ore dal prelievo. Nel periodo 1998- maggio 2001 l'analisi era effettuata dal SF-9000 (DASIT), successivamente dal SE-3000. L'elaborazione statistica è stata eseguita con il programma Microsoft Excel.

RISULTATI: sono state scartate nel quadriennio in analisi 956 unità, pari al 0.29% di quelle raccolte. L'84.8% delle cause di scarto era rappresentato da neutrofilia, linfocitosi assoluta ed eosinofilia. Tra le unità scartate si sono trovati tre donatori asintomatici affetti da leucemia linfatica cronica, uno da leucemia mieloide acuta e uno da leucemia mieloide cronica. Le alterazioni dell'EM rappresentano la seconda causa di scarto delle unità dopo il movimento dell'ALT.

DISCUSSIONE: L'eliminazione di più di 200 unità all'anno per via dell'emocromo alterato rappresenta una perdita senz'altro evitabile se si eseguisse l'EM prima della donazione. Tuttavia la maggior parte della raccolta è eseguita sul territorio per cui lo sforzo organizzativo per mantenere accettabile la qualità dell'analisi svolta in loco non pare giustificato.

BIBLIOGRAFIA: Facco G. et al. Linfocitosi relativa e idoneità alla donazione: esperienza del Centro Trasfusionale AVIS di Torino. *Trasf. Sang.*, 41, 181, 1997.

IL DOSAGGIO DEL RECETTORE SOLUBILE DELLA TRANSFERRINA IN ANEMIE DELL'ETÀ PEDIATRICA

Di Pascale G.*, Grimaldi E.°, Catapano R.*, De Rosa A.*, De Caterina M.°

*Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Santobono, Via Mario Fiore 6, 80129 Napoli;

°Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Universitaria Policlinico Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Napoli.

Il recettore solubile della transferrina (sTfR) è un parametro diagnostico di recente introduzione, in grado di fornire indicazioni aggiuntive sullo status del ferro e sull'attività eritropoietica (1). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'affidabilità analitica in termini di imprecisione, linearità e confrontabilità dei risultati di un metodo immunonefelometrico (INA) introdotto di recente dalla Dade-Behring con il metodo immunoenzimatico (EIA) della Eurogenetics e stabilire il range di riferimento in età pediatrica. Ne è stata inoltre valutata l'efficienza diagnostica nel discriminare le anemie sideropeniche (IDA) dalle anemie da malattia cronica (ACD). Il metodo INA della Dade Behring utilizza particelle di polistirene, sensibilizzate con anticorpi monoclonali anti-sTfR di topo, che vengono agglutinate dall'sTfR contenuto nel campione. La concentrazione di sTfR è determinata dall'intensità della luce dispersa nel nefelometro con angolo da 13 a 24 gradi rispetto alla luce incidente. Sono stati raccolti i sieri di 34 soggetti sani, 21 affetti da IDA e 18 da ACD, tutti compresi tra 1 e 12 anni. Sono state osservate una buona precisione con Coefficienti di Variazione compresi tra 1.6% e 2.4% ed una eccellente linearità ($r = 0.993$ $p < 0.0001$). I valori ottenuti con il metodo INA sono risultati paragonabili a quelli ottenuti con il metodo immunoenzimatico (slope = 0.7; intercept = 0.114; $r = 0.928$; $p < 0.001$) pur essendo sottostimati rispetto ad esso mediamente di 0.548 mg/L (95% CI = -0.695 -0.401). Il range di riferimento ottenuto è stato 1.04 - 2.5 mg/L. Nella diagnosi differenziale tra IDA e ACD, sTfR ha evidenziato una bassa efficienza diagnostica (48.7%). Migliori risultati sono stati ottenuti con sTfR Index (sTfR/log ferritina) che ha rivelato una elevata specificità (94.4%) ed una sensibilità del 76.2% con una efficienza del 84.6%. I nostri dati indicano che il metodo in esame fornisce risultati affidabili e comparabili a quelli del metodo EIA, ma il tempo di saggio di sTfR nel siero è ridotto da circa 2 ore a 12 minuti. Inoltre sTfR in combinazione con la ferritina (sTfR Index) sembra costituire un valido ausilio diagnostico nel discriminare tra IDA e ACD (2,3).

1. Baynes, R.D., *Clin. Biochem.*, 1996, 29, 209-215.2. Suominen, P., Rajamaki A., Irjala K., *Blood*, 1998, 92, 2934-2939.3. Suominen, P., Punnonen, K., Rajamaki, A., Irjala K., *Clin. Chem.* 1999, 45, 8, 1302-1305.

LEPTINA E FUNZIONALITÀ TIROIDEA: POSSIBILI CORRELAZIONI IN BAMBINI CON SINDROME DI DOWN

Magni P.¹, Ruscica M.^{1,2}, Coppi R.¹, Martos-Riano V.¹, Motta M.¹, Licastro F.³, Corsi M.M.¹

¹Istituto di Endocrinologia, Facoltà di Farmacia, Università di Milano; ²Istituto di Patologia Generale, Laboratorio di Patologia Clinica, Facoltà di Medicina, Università di Milano; ³Cattedra di Immunologia, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Bologna.

Attraverso questo studio abbiamo cercato di evidenziare, in soggetti in età infantile con Sindrome di Down, possibili correlazioni fra i livelli plasmatici di leptina e parametri collegati alla funzione tiroidea (TSH, fT3, fT4), anche alla luce dei numerosi studi, tuttavia tutti con dati contrastanti, tesi, a valutare se leptina ed ormoni tiroidei rappresentino due regolatori indipendenti del metabolismo energetico, o se, al contrario, vi sia una stretta correlazione tra i due sistemi. Ci siamo, infine, proposti di valutare, mediante l'ausilio di una tecnica cromatografica di esclusione molecolare (FPLC=fast protein liquid chromatography), la distribuzione della leptina plasmatica tra la forma libera - presumibilmente la forma attiva - e quella legata - complessata con macromolecole nel tentativo di stimare un diverso ruolo fisiologico tra le due forme, come già ipotizzato in letteratura. Pazienti, materiali e metodi. I pazienti inclusi nel presente studio sono bambini in età prepuberale, di ambo i sessi (8 maschi e 10 femmine), tutti affetti da Sindrome di Down, in cui sono stati valutati i parametri antropometrici - quali BMI e spessore della plica tricipitale, e dosati le concentrazioni sieriche di TSH, fT3, fT4 e leptina. Per la separazione della forma libera della leptina da quella legata è stata usata la metodica FPLC; le frazioni così ottenute sono state in seguito dosate con la metodica RIA per la leptina umana.

Risultati. I livelli plasmatici degli ormoni tiroidei fT3 e fT4 e del TSH nella popolazione studiata non mostrano significative correlazioni con l'età. Si è potuto, tuttavia, osservare una tendenza alla riduzione della concentrazione dell'ormone TSH con l'avanzare dell'età dei soggetti.

Successivamente, sono stati valutati gli indici di adiposità, ovvero BMI e plica tricipitale, in relazione all'età dei bambini Down. L'andamento sia del BMI che dello spessore della plica tricipitale rimangono sostanzialmente invariati in funzione dell'età e anche in questo caso tale dato non raggiunge la significatività statistica. Una netta significatività è stata, invece, raggiunta dalla correlazione tra BMI e spessore della plica tricipitale, rivelandosi, dunque, questi ultimi degli indici di adiposità affidabili. Tale correlazione non è più riscontrabile nel gruppo con TSH < 5 mUI/L. Questo studio non ha evidenziato alcuna correlazione tra età e leptina plasmatica, sia essa considerata singolarmente che rapportata agli indici di adiposità. Positiva è risultata la correlazione tra leptina e BMI, così come quella tra leptina e spessore della plica tricipitale. Nel gruppo di soggetti con TSH > 5 mUI/L - e quindi con ipotiroidismo subclinico - l'età correla significativamente con i parametri antropometrici e i livelli plasmatici di leptina. Si è voluto, infine, correlare il valore sierico della leptina, sia

singolarmente che corretta con gli indici di adiposità, con le concentrazioni plasmatiche di fT3, raggiungendo la significatività statistica solo nel caso della correlazione diretta con la leptina normalizzata con lo spessore della plica. La significatività non è stata raggiunta mettendo in relazione i livelli di leptina, sia tal quale che rapportata agli indici di adiposità, con la concentrazione plasmatica di fT4 e con i livelli plasmatici di TSH.

Conclusioni. Questo studio ha evidenziato, innanzitutto, una correlazione tra i livelli plasmatici di leptina e gli indici di adiposità, quali il BMI e lo spessore della plica tricipitale. I profili di eluizione ottenuti suggeriscono che la percentuale di leptina libera aumenta con l'incremento degli indici di adiposità così come confermato dalla letteratura.

Al contrario, la correlazione tra leptina ed ormoni tiroidei non mostra significative correlazioni tra il valore sierico della leptina e le concentrazioni plasmatiche di fT3, fT4, TSH. Valutando, inoltre, l'andamento dei livelli plasmatici degli ormoni della funzionalità tiroidea in funzione dell'età dei soggetti considerati, sebbene in nessuno dei tre casi vi sia apparentemente una significativa correlazione tra le due variabili, si è potuto, tuttavia, osservare un lieve decremento della concentrazione dell'ormone TSH con l'avanzare dell'età dei pazienti. In conclusione, i risultati del presente studio forniscono una prima serie di informazioni relative a due componenti ormonali (asse ipofisi-tiroide e leptina) coinvolte entrambe nella regolazione del metabolismo energetico in una popolazione di soggetti con Sindrome di Down in età prepubere.

STABILITY OF THYROID HORMONES AFTER REFRIGERATED STORAGE: COMPARISON BETWEEN PLASMA AND SERUM SAMPLES

Carrozza C., Lulli P., Bartocci R., Bataloni V., Maceratesi M.L., Zagarella R.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Servizio di Analisi Ormonali, Policlinico Universitario A. Gemelli, Largo A. Gemelli 8, 00168 Roma.

In order to optimise the pre-analytic phase, we proposed to investigate the effect of different sample types, i.e. Litheparinised plasma versus serum, on thyroid hormones measurements. Moreover, we evaluated the effects of refrigerated storage on 5 days consecutive results.

TSH, fT3 and fT4 concentrations in plasma and serum samples, drawn from 25 patients attending our hospital outpatient unit, were tested on two different analysers, Centaur®Bayer and Elecsys 2010®Roche.

The correlation coefficient of data for plasma vs. serum for the two analysers is reported in the table below:

Table 1

	ELECSYS	CENTAUR
TSH	0.99	0.44
fT3	0.94	0.87
fT4	0.96	0.85

Our results indicate that plasma samples, especially for TSH, cannot be analysed by Centaur®Bayer, as reported on the instruction manual. No differences between serum and plasma samples were observed using Elecsys2010®Roche.

The differences observed in the results of five consecutive days (storage at 4°C) were expressed as percentage of variation (%) at 3rd and 5th day.

Table 2

ELECSYS

Days	Serum		plasma	
	3 rd	5 th	3 rd	5 th
TSH	3.8	18.5	4.2	14.0
fT3	3.1	5.0	3.1	5.9
fT4	2.4	3.5	2.4	4.0

CENTAUR

Days	Serum		plasma	
	3 rd	5 th	3 rd	5 th
TSH	2.4	10.3	4.6	20.1
fT3	1.7	3.0	1.4	3.9
fT4	3.7	5.7	2.3	4.6

As shown in Table 2, plasma and serum fT3 and fT4 concentrations were stable on samples stored at 4°C for 5 days, while the stability of TSH was maintained only for 3 days, for both analysers.

DOSAGGIO DEGLI ANTICORPI ANTI-GAD NELLA DIAGNOSI E PREDIZIONE DELL'INSULINO-DIPENDENZA: NOSTRA ESPERIENZA

Borghi M.F., *Zavaroni D.

Laboratorio Medicina Nucleare, Ospedale G. da Saliceto, Piacenza; *U.O. Diabetologia, Osp. Piacenza

Scopo di questo studio è stato quello di valutare i livelli sierici di GADA e di C-Peptide (C-Pep) basale in un gruppo di pazienti con Diabete Mellito (DM) tipo2 di recente riscontro e di seguire nell'arco di 4 anni l'evoluzione della malattia per valutare quanti di questi pazienti avrebbero richiesto nel tempo la terapia insulinica. Sono stati reclutati, nel 1998, 65 pazienti con DM tipo2 di recente insorgenza (entro 2 anni dalla diagnosi) 30M/35F di età' 47±8 anni BMI 22-27. In ciascuno è stato eseguito il dosaggio sierico del C-Pep basale (BYK GULDENRIA) e dei GADA (metodo radio legante con GAD65 ricombinante umano (MEDIPAN DIAGNOSTICA). La precisione intraassay ed interassay ha CV% <7%. E' stato identificato un cut-off scegliendo come gruppo di controllo 51 pazienti con una storia clinica negativa per DM ed equivalenti ai pazienti diabetici oggetto del nostro studio. La media era 0.29 ± 0.11 U/ml (range 0.2-0.64 U/ml). Il cut-off era posto a 0.64 U/ml corrispondente a +3DS. 7 pazienti presentavano livelli di GADA molto alti (76.6 U/ml ± 18.9 E.S.) e livelli di C-Pep basale bassi (0.83±0.22 ng/ml). Questi iniziavano la terapia insulinica intensiva a breve. Dei 58 pazienti rimanenti, 19 presentavano livelli di GADA superiori al cut-off (0.97±0.34 U/ml) e livelli di C-Pep (1.18±0.31 ng/ml). Di questi 19, 16 pazienti (84%) richiedevano passaggio alla terapia insulinica nei 4 anni successivi. I rimanenti pazienti (39 pazienti) con livelli di GADA inferiori al cut-off (0.25±0.03 U/ml) mantenevano un discreto compenso (HbA_{1c} <8%) con terapia euglicemizzante orale e dieta. Questi 39 pazienti mostravano un C-Pep basale di 3.3±1.1 ng/ml significativamente superiore a quello dei pazienti che avevano avuto necessità di iniziare la terapia insulinica p<0.001. I livelli di GADA nel gruppo di pazienti che era dovuto passare alla terapia insulinica erano significativamente più alti rispetto al gruppo di pazienti che continuava la terapia con euglicemizzanti orali (p<0.002). L'84% dei pazienti GADA positivo ha richiesto il passaggio alla terapia insulinica entro 4 anni dalla diagnosi.

Nel nostro studio il riscontro di livelli di GADA superiori al cut-off in pazienti diabetici di tipo2 di recente diagnosi è risultato un possibile marker prognostico di indicazione alla terapia insulinica.

IL COMPORTAMENTO DELLA LEPTINA IN PAZIENTI CON AMENORREA IPOTALAMICA ED IN DONNE SANE

°Bugari G., °Iacobello C., °Busi D., *Gambera A., *Andrico S., *Specchia C., *Pellegrini C., °Albertini A.

°3 Laboratorio Analisi, Spedali Civili - Brescia

*Dip. di Ginecologia Endocrinologica - Univ. di Brescia

La leptina è un ormone secreto con ritmo circadiano dagli adipociti con azione regolatoria sul Sistema Nervoso Centrale e sull'ovaio. A livello ipotalamico agisce sul centro della fame-sazieta (NPY) e sui nuclei arcuato e paraventricolare che regolano la funzione endocrina e riproduttiva. Nell'Amenorrea Ipotalamica Funzionale (AIF), cioè amenorrea di origine centrale non dovuta a lesioni organiche cerebrali o delle ghiandole endocrine, si ha una iperattivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e una ridotta attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio che si ipotizza imputabile anche all' ipoleptinemia.

Scopo dello studio è verificare il comportamento della leptina in pazienti con AIF ed in un gruppo di controllo costituito da donne sane, omogenee per età e peso e suddivise in classi in base al Body Mass Index (BMI).

Metodi: Il dosaggio della leptina è stato eseguito utilizzando il kit Human Leptin RIA DRG - Tema Ricerca - Bologna.

Analisi statistica: t di Student, ANOVA a 4 o 3 vie e regressione lineare.

Risultati in Tabella: *Livelli di Leptina in differenti gruppi di BMI in pazienti con AIF e controlli.*

(P in Tabella è ANOVA a 4 o 3 vie).

BMI	Kg/m ²	SOTTOPESO		NORMOPESO		P
		15-16	17-18	19-21	22-24	
AIF n=82	N°- (%)	4(4.9)	20(24.3)	36(43.9)	22(26.9)	0.001
	peso (kg)	42.3±6.8	48.7±4.1	53.8±5.2	62.6±4.5	
	Leptina (ng/mL)	4.0±1.6	5.2±2.3*	6.4±2.2*	10.2±3.4*	
Donne sane n=65	N°- (%)	-	9 (13.8)	33 (50.8)	23 (35.4)	0.001
	peso (kg)	-	48.3±3.2	54.7±5.9	62.2±5.9	
	Leptina (ng/mL)	-	7.3±2.8	10.0±2.4	16.0±2.4	

Test t di Student: *p<0.001 AIF vs Controlli

°p<0.05 AIF vs Controlli

I nostri risultati dimostrano che l'ipoleptinemia è caratteristica dell'AIF ed è presente anche in pazienti con normale BMI. L'analisi di regressione mostra che la leptina è linearmente e positivamente correlata con peso e BMI sia nell'AIF che nei controlli, ma ha un andamento significativamente diverso in donne con AIF rispetto ai soggetti normali.

In conclusione i nostri dati indicano che il bilancio energetico (apporto calorico/dispensio energetico) è in grado di regolare, indipendentemente dalle riserve di grasso corporeo, la secrezione di leptina.

Diabetes 1996; 45: 1455-1462.

J. Clin. Endocrinol Metab. 2002; 87(2): 500-505.

PERFORMANCE EVALUATION OF TG AND TPO AUTOANTIBODIES ASSAYS USING THE AXSYM ANALYSER.

°Ruggeri G., °Faustini M., °Carasi F., °Gobbi E., °Belloli S., *Bettinsoli G., °Albertini A.

°3 Laboratorio Analisi, *Medicina Nucleare, A.O. Spedali Civili - Brescia

Autoimmune thyroid disease (AITD) causes cellular damage and alters thyroid gland function by humoral and cell-mediated mechanisms. Thyroperoxidase antibodies (TPOAb) are involved in the tissue destructive processes associated with hypothyroidism observed in Hashimoto's and atrophic thyroiditis. Thyroglobulin antibodies (TgAb) are measured in addition to serum Tg test, because TgAb can interfere with Tg measurement. TPOAb and/or TgAb are frequently present in sera of patients with AITD. The presence of thyroid autoantibodies is also demonstrated in patients with non-thyroid autoimmune diseases such as type I diabetes.

The aim of this study was to evaluate the performance of new microparticle based immunoassays (MEIA) for TG-Ab and TPO-Ab detection using AxSYM analyser (ABBOTT), comparing the results with two radioimmunoassay methods (ANTI-hTG IRMA Kit, Immunotech; and TPO Ab one-step RIACT, Radim S.p.A.). Precision of the assays was tested according to NCCLS guidelines and statistical analysis was carried out using the random effect Anova model. The within-run CVs, between-run CVs and total CVs for Tg-Ab were in the ranges 3.6-10%, 7.7-13% and 8-12 respectively. The corresponding values for TPO-Ab were 3.6-5.4%, 7.7-8.9% and 8-13%.

We analyzed 167 subjects including: normal controls, patients with diabetes type I (12), thyroiditis (19) and thyroid carcinomas (12). Twenty nine were males (aged 5-75 years) and 131 were female (aged 16-79 years). 128 samples have been analyzed for TPO-Ab by both methods, resulting 97 positive and 28 negative. The disagreement was limited to 3 samples, leading the agreement between two methods to 95%. 124 samples, have been analyzed for Tg-Ab by both methods, resulting 72 positive and 35 negative. 15 samples showing a disagreement resulted all positive (although borderline) by AxSYM but not by the IRMA assay. All of these were from patients with diagnosed thyroid diseases showing high levels of TPO-Ab by both methods. This suggests a higher clinical sensitivity of the Abbott system.

Hollowell JG, Stachling NW, Flanders WD, Hannon WH, et al Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)

J Clin Endocrinol Metab, 2002 Feb;87 (2): 489-499

ANDROGENI, INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I) E PROTEINE VETTRICI (SHBG E IGFBP-3) IN POSTMENOPAUSA

°Bugari G., °Iacobello C., °Franceschini R., *Gambera A., *Scagliola P., *Falsetti L., °Albertini A.

°3 Laboratorio Analisi, Spedali Civili - Brescia

*Dip. di Ginecologia-Endocrinologica -Univ. di Brescia

In ginecologia endocrinologica gli ormoni più studiati in donne in peri e postmenopausa sono indubbiamente gli estrogeni, sia per la loro tipica riduzione che per gli effetti positivi della loro somministrazione. Pochi dati sono invece disponibili circa le modificazioni degli androgeni, delle Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) delle Insulin-Like Growth Factors (IGF-I) e delle IGF Binding Proteins (IGFBPs).

Lo studio valuta l'andamento di androgeni, SHBG, IGF-I e IGFBP-3 in donne sane, normopeso, normale funzionalità tiroidea, non sottoposte a terapie sostitutive ed in menopausa da 2-4 (Gruppo A), 9-12 (Gruppo B) e 19-22 (Gruppo C) anni; evidenzia inoltre le differenze con l'età fertile e le variazioni fra i singoli gruppi.

Metodi: RIA per Androstenedione (A), Testosterone libero, DHEA (DSL, Inc Webster, TX) e IGF-I, IGFBP-3 (Nichols Instit. GmbH, Germany); chemiluminescente per DHEA-S, SHBG (Immulate 2000 Medical Systems) e Testosterone (T) (Vitros EcI, Ortho Clinical Diag.). **Analisi statistica:** t di Student e ANOVA a 4 vie.

Risultati in Tabella

Età fertile	n=72	Postmenopausa			p<
		A = 40	B = 37	C = 18	
A	1.82±0.41	1.23±0.30*	1.1±0.21*	0.91±0.22*	0.001
(ng/mL)	%	-32.4	-39.5	-50.5	
T	0.35±0.18	0.29±0.17	0.27±0.11§	0.24±0.15°	0.05
(ng/mL)	%	-17.1	-22.8	-31.4	
T libero	1.44±0.62	1.14±0.39§	1.03±0.32	0.90±0.31*	0.001
(ng/mL)	%	-20.8	-28.4	-37.5	
DHEA	9.31 ± 4.59	5.65±3.41*	5.0±3.01*	3.72±2.83*	0.001
(ng/mL)	%	-39.3	-46.3	-60.0	
DHEA-S	1.92±0.51	1.22±0.60*	1.10±0.52*	0.85±0.38*	0.001
(ng/mL)	%	-36.4	-42.7	-55.7	
SHBG	51.1± 9.6	48.2± 6.4	46.1±9.1°	46.2 ± 10.1	0.05
(ng/mL)	%	-5.7	-9.7	-9.6	
IGF-I	191.5±30.3	155±23.2*	128.4±18.4*	96.8±21.3*	0.001
(ng/mL)	%	-19.0	-32.9	-49.4	
IGFBP-3	2.83 ± 0.42	2.72±0.4	2.51±0.53§	2.3±0.30*	0.001
(ug/mL)	%	-3.9	-11.3	-18.7	

*p< 0.001 gruppo vs-Età fertile-§p< 0.005 gruppo vs Età fertile-°p< 0.05 Gruppo vs Età fertile

I risultati mostrano diminuzione di androgeni, SHBG, IGF-I e IGFBP-3 ed evidenziano che l'ovaio, principale fonte di androgeni in età fertile, mantiene la capacità di secernere T per alcuni anni dopo la menopausa. Le variazioni delle IGFBP-3 sono inferiori rispetto a quelle delle IGF-I poiché risentono della minore secrezione di GH che si verifica con l'età, dimostrando differente comportamento in menopausa. Lo studio offre una base per rilevare le eventuali deviazioni di androgeni, SHBG, IGF-I e IGFBP-3 dai livelli normali e le possibili ripercussioni cliniche su patologie età-dipendenti nelle donne in postmenopausa (metabolismo lipidico e osseo, apparato cardiovascolare, SNC, rischio oncologico).

J Clin Endocrinol Metab 2000;85 (8):2832-8

COMPARISON OF VIDAS TESTOSTERONE ASSAY WITH CHEMILUMINESCENCE AND RIA METHODS

Grasso L., Fragomeni F., Pasqualetti F., Cecconi E., Centoni R., Canale D., Gasperi M.

Department of Endocrinology University of Pisa, Pisa.

Aim: purpose of the study was to compare the results of testosterone (T) evaluation by VIDAS, a new Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) with those obtained by chemiluminescence and RIA, in different clinical situations. **Materials and Methods:** 69 sera were analysed in duplicate: 15 were from hypogonadal male subjects, 16 sera were from patients after HCG stimulation test, 17 from hypogonadal male patients during T therapy and 21 from hirsute women. Commercial kits were used for assays: VIDAS Testosterone (BioMerieux sa), Total Testosterone IMMULITE 2000, TESTO-CTK, Dia Sorin s.r.l.

Results:

TESTOSTERONE ng/ml	VIDAS	IMMULITE	TESTO-CTK
Males	3,0-10,6	2,2-15,1	2,7-10,9
Females	0,1-1,2	0,5-1,2	0,1-1,1
hypogonadism	<0,1-3,4	<0,2-3,5	<0,1-1,1
Males			
HCG stimulation	0,7-8,8	1,2-6,7	0,9-8,2
therapy monitoring	1,1-13,0	0,7-12,8	1,4-9,4
Females hirsutism	0,2-1,1	0,3-1,9	0,8-1,9

Overall, a very good correlation was found between VIDAS results and those obtained by the other two methods ($r=0.939$ and $r=0.925$ Vs IMMULITE and TESTO-CTK, respectively). Considering different patient groups, correlation was again very strong in hypogonadal males ($r=0.851$ and $r=0.890$), during HCG ($r=0.974$ and $r=0.968$) and during substitution therapy ($r=0.889$ and $r=0.868$), in hirsute female correlation was somewhat lower ($r=0.774$ and $r=0.443$ Vs IMMULITE and TESTO-CTK, respectively). **Conclusion:** ELFA T assay is a good diagnostic tool, particularly in male hypogonadism both in absence of treatment and during therapy. Regarding hirsutism, in the present study diagnosis had been made on clinical grounds and most of the patients where affected by so-called idiopathic hirsutism, which is characterized by androgen levels within normal limits. The estrogen status, as well as the levels of Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) in these patients, had not been investigated: an interference of these factors in the assay system cannot be ruled out and should be looked for in the future.

ESTROGEN RECEPTOR BETA AND TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN HUMAN COLORECTAL CANCER

Cavallini A., Messa C., Pricci M., *Caruso M.L., Di Leo A.

Laboratory of Biochemistry, *Laboratory of Pathology IRCCS "S. de Bellis" - Castellana Grotte (BA).

Introduction. Epidemiological and experimental studies have suggested the involvement of sex steroids in human colorectal tumor, and many studies have also report that the ER- β , as compared to ER- α , is the greatest responsible of the estrogen-responsiveness of this tissue. In addition, the function of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in human colorectal adenocarcinoma is unclear. The aims of this study was (i) to evaluate the relative distribution of the ER- β mRNA in colorectal neoplastic tissues matched with adjacent normal mucosa, and (ii) to correlate these data with grade of TIL of these tumors.

Methods. Colorectal carcinoma tissue and adjacent normal mucosa were obtained from 50 patients (32 males, 66 ± 10 years and 18 females, 71 ± 11 years). All the women were in the postmenopausal period and none had received any hormone therapy. The ER- β mRNA levels (arbitrary units of fluorescence or a.u.f) were normalised to that of β -actin by RT-nested PCR. The grade of infiltration were scored by two pathologists in double-blind fashion and tumor section were sorted into three groups: 0 (without infiltration), I (all intermediate patten of infiltration) and II (intensive grade of infiltration). The ER- β proteins were revealed immunohistochemically in both group I and II. The change in ER- β mRNA levels in both tissue types were analysed by Wilcoxon signed rank test, whereas the association between ER- β mRNA levels and grade of inflammation by nonparametric Kruskal-Wallis test.

Results. Increased levels of ER- β mRNA were found in malignant tissues than adjacent normal mucosa (198.8 ± 46.9 a.u.f. vs. 174.1 ± 47.6 a.u.f., respectively, $p=0.001$). As to the grade of inflammation, 20 tumor sections were assigned to group 0, 23 tumors to group I and 7 to group II. The values of the ER- β mRNA levels were then assigned to each group. The ER- β was lower in group II (180.3 ± 59.6 a.u.f.) than groups 0 and I (211.4 ± 52.4 and 202.0 ± 48.4 a.u.f., respectively) that showed similar levels. Statistical analyses: group II vs. group 0, $p=0.03$; group II vs. group I, $p=0.03$; group 0 vs. group I, $p=0.41$. However, the immunohistochemical analysis showed that the lymphocytes in all tissue sections of group I and II were ER- β protein-negative.

Conclusions. The change of the ER- β mRNA expression in human colorectal neoplastic tissue, as compared to adjacent normal mucosa, are not related to grade of inflammation of this tissue.

Reference: Current drug targets-immune, endocrine & metabolic disorders I: 1-12, 2001.

MEASUREMENT OF SULPHOCONJUGATED AND FREE CATECHOLAMINES IN HEART FAILURE

Prontera C., Iervasi A., Emdin M., Mercuri A., Zucchelli G.C.

CNR, Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Plasma catecholamines (CAs, adrenaline -A-, noradrenaline -NA-, dopamine -DA-) are present either as free or as conjugated form (glucuronide and sulphate); the major fraction is present as conjugated, mainly as sulphoconjugated. While free catecholamines levels are currently used as a tool for assessing the activity of the adrenergic nervous system in patients with heart failure, the biological significance of the sulphoconjugated CAs is still unclear. We assayed free and sulphoconjugated CAs in plasma samples (withdrawn after 30' supine position) from 32 normal subjects and from 35 patients with heart failure. The measurement of the two forms of CAs was performed subdividing plasma samples into two fractions and submitting one of these to enzymatic hydrolysis with arylsulphatase to hydrolyse the sulphoconjugated forms. Thereafter, we simultaneously measured by a fully automated HPLC analyser based on fluorescence detector (HLC-725, Eurogenetics-Italia, Torino), the concentration of both total CAs in the hydrolysed fraction, and free CAs in the untreated fraction. The sulphoconjugated CAs concentration was calculated by subtracting the free from the total values.

The between-assay precision for the assay of free CAs and for the assay of total CAs, was observed repeatedly assaying two pools (high pool and low pool) in 25 different runs; in all cases the precision was found of 10 CV% or below. Sulphoconjugated forms in normal subjects account for 73.6% of total A, for 78.5% of total NA and more than 99% of total DA. Very similar data have been found in patients affected by heart failure (sulphoconjugated forms accounts for 73.5% of total A, for 79.6% of total NA and 99% of total DA).

Free NA (809 ± 62 vs. 331 ± 124 pg/ml) and DA (130 ± 433 vs. 9.4 ± 13 pg/ml), but not A, were significantly ($p<0.01$) increased in heart failure patients as compared to healthy controls. Similarly sulphoconjugated NA (3264 ± 1935 vs 1280 ± 594 pg/ml) and DA (9328 ± 8354 vs 5656 ± 2418) were markedly increased in heart failure patients towards normals. The plasma concentrations of free NA and DA were significantly related to their sulphoconjugated levels ($r=0.66$; $p<0.01$). Our preliminary data indicate that, in spite of increased levels of plasma NA and DA in heart failure, the measurement of their sulphoconjugated forms towards free doesn't provide additive information in this condition. The ratio free/sulphoconjugated CAs is almost the same both in normal and in patients with heart failure, indicating that in patients with heart failure the balance between production and degradation of CAs is maintained despite the increase of their total levels.

COMPARISON BETWEEN STANDARD AND RAPID ASSAY FOR INTRAOPERATIVE GASTRIN MEASUREMENTS

Lulli P., Carrozza C., Dominici L., Pelliccioni G., Serva P., Santini S.A.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Servizio di Analisi Ormonali, Policlinico Universitario A. Gemelli, Largo A. Gemelli 8, 00168 Roma.

The surgeons' request for intraoperative "rapid" hormonal assay has become more frequent in the last years. Despite the advances achieved for preoperative localisation of the lesions, the surgical treatment of gastrinomas remains difficult. Hence, the usefulness of an intraoperative gastrin assay for successful resection of gastrin-secreting tumors. Our routine immunoradiometric assay (GASK-PR; Cis BioInternational, Gif Yvette, France) used to determine serum gastrin levels was then modified for this purpose, by shortening the incubation time to 30 minutes at 37°C to be compatible with the surgical procedures.

Serum gastrin levels of 14 normal subjects and of 5 patients with gastrinoma were measured using the standard procedure (incubation at 25°C for 2 hours) and with the proposed modification (incubation at 37°C for 30 minutes). Our results showed a good correlation between the two procedures ($R^2 = 0.99$, slope = 0.90) in the range 30-13000 pg/ml.

Furthermore, we also made recovery tests, adding scalar concentrations of gastrin standard (270 pg/ml) to human serum specimens, in order to cover the diagnostic range (20-250 pg/ml). The recovery percentage for gastrin in the samples ranged between 92% and 110% for the standard method and between 100% and 128% for the rapid assay. Each sample was analysed 3 times for evaluating the precision intra-run CV% which was < 12%, for both assays. In conclusion, our results demonstrate that the proposed modification of the standard method can be easily employed as intraoperative gastrin assay, as well as in the routine measurements.

VALUTAZIONE DEI LIVELLI SIERICI DI FOSFATASI ACIDA TARTRATO RESISTENTE IN PAZIENTI IN TERAPIA CON AREDIA®

Martinetti A., Seregni E., Ferrari L., Biancolini D., Ripamonti C., Pallotti F., Coliva A., Celio L., Bombardieri E.

Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura Tumori, Via Venezian 1, 20133 Milano

Introduzione. I livelli sierici di fosfatasi acida tartrato resistente isoforma 5b (TRAP) sono indice di attività osteoclastica. Recentemente è stato sviluppato un saggio immunoenzimatico che potrebbe essere impiegato in routine. *Scopo dello studio.* Verificare l'andamento dei livelli di TRAP durante terapia con il difosfonato Aredia®. Inoltre studiare l'eventuale correlazione del TRAP con l'efficacia di tale trattamento in termini di riduzione del dolore e/o dell'utilizzo di analgesici, in pazienti (pz) con metastasi ossee da carcinoma della mammella. *Pazienti e metodi.* Per la valutazione dei livelli sierici di TRAP è stato utilizzato il nuovo metodo ELISA BoneTRAP® Assay (Suomen Bioanalytiikka Oy, Finlandia). Questo metodo è caratterizzato dall'utilizzo di un anticorpo monoclonale umano specifico per l'isoforma 5b. Lo studio è stato condotto su 28 pz trattate con Aredia® 60 mg in infusione di 2 ore, secondo il seguente schema: 3 infusioni in 14 giorni ogni 21 giorni per due volte (1° e 2° ciclo) e successivamente un'infusione ogni 21 giorni. Tutte le pz hanno ricevuto un adeguato trattamento analgesico. I prelievi ematici per la valutazione del marcatore sono stati effettuati durante i primi 2 cicli di trattamento. *Risultati.* Le pz. sono state suddivise in due gruppi in base alla variazione dell'intensità del dolore e dell'utilizzo di analgesici durante il trattamento. 15 pz (gruppo A) hanno riportato una diminuzione del dolore e/o del consumo di analgesici mentre 13 pz (gruppo B) non hanno avuto benefici in questi due parametri. I livelli basali di TRAP non sono risultati diversi nei due gruppi. In tabella sono riportati i livelli sierici mediani del marker con la riduzione percentuale rispetto al basale, nei due gruppi di pz.

Ciclo		Gruppo A TRAP U/L (%)	Gruppo B TRAP U/L (%)
1°	Basale	5.62	8.22
	7 gg	3.27 (38.65)*	5.36 (18.36)
	14 gg	2.77 (51.21)**	5.54 (33.81)
	35 gg	3.29 (43.22)	6.25 (31.40)
2°	14 gg	2.78 (52.26)**	4.61 (33.64)
	35 gg	3.38 (49.72)*	5.84 (24.57)

Wilcoxon test gruppo A vs B * $p=0.01$ ** $p=0.001$

Conclusioni. In tutte le pz i livelli sierici di TRAP sono significativamente diminuiti. Inoltre il grado di soppressione del TRAP sembra predire la capacità del trattamento con Aredia® di controllare il dolore e di ridurre l'utilizzo di analgesici.

**EVIDENZIAMENTO MACROPROLATTINEMIA:
POSSIBILE SUA MEDIANTE TRATTAMENTO DEI
CAMPIONI CON POLYETILENGLICOLE.**

Menapace P., Marcolla A., Mattevi E.

A.P.S.S. Trento, Dipartimento di Laboratorio, Ospedale di Cles, Laboratorio analisi.

Viene segnalata in letteratura la presenza di casi di sovrastima del valore della prolattina (PRL) su campioni di siero in presenza di macroprolattina.

La macroprolattina, composta da 4 molecole monometriche di PRL e anticorpi IgG, sembra abbia una minima attività biologica in vivo, ma reagisca in modo analogo alla PRL monometrica con i test commerciali per il dosaggio della PRL.

Viene riportato come il trattamento dei campioni con (PEG) possa essere usato con successo nello screening della macroprolattina.

Nel presente lavoro abbiamo voluto verificare se anche con la strumentazione da noi usata (Elecsys – Roche) si riscontrava quanto riportato in letteratura.

Abbiamo raccolto i campioni di 28 pazienti afferite al nostro laboratorio tra gennaio e aprile 2002 e che presentavano valori di PRL superiori a 30 ng/ml.

I sieri dopo il primo dosaggio sono stati congelati a -20°C . Al momento della esecuzione dei dosaggi riportati i sieri sono stati scongelati riportandoli a t. ambiente. Su di una aliquota degli stessi si è eseguito nuovamente il dosaggio della PRL. Ad una seconda aliquota di 0.4 ml sono stati aggiunti 0.4 ml di una soluzione al 25% di PEG 6000 Kda. Dopo agitazione tale soluzione veniva centrifugata a 1500 giri per 30' e quindi eseguito il dosaggio della PRL sul supernatante.

I risultati dei dosaggi eseguiti sui sieri non trattati prima e dopo scongelamento non hanno dato differenze significative. I risultati dei dosaggi ottenuti prima e dopo trattamento dei campioni con PEG danno luogo invece a due serie di valori che presentano uno scostamento medio del 49.3 %. Ben 15 campioni danno una differenza tra i valori di PRL misurati prima e dopo trattamento con PEG superiore al 50%, mentre 13 hanno dato una differenza inferiore al 20%.

Anche dai nostri dati emerge evidente il problema di una discriminazione tra iperprolattinemia vera o apparente. Riteniamo auspicabile un approfondimento dello stesso sia sotto gli aspetti laboratoristici che clinici ed indagare la possibilità di avere a disposizione un metodo semplice ed affidabile per poter rilevare la presenza di macroprolattina onde evitare indagini di approfondimento o trattamenti farmacologici inutili.

Bibliografia:

H. Leslie, C. H. Courtney et alii. - Laboratory and Clinical

VASOACTIVE FACTORS IN CHRONIC LIVER DISEASE

Del Ry S., Catapano G., Maltinti M., Mannucci F., Prediletto R., Giannessi D.

CNR, Institute of Clinical Physiology, Via Moruzzi 1, Pisa, Italy

Advanced liver disease is frequently accompanied by pulmonary circulatory abnormalities manifested by widespread intrapulmonary vascular dilations and blunted hypoxic vasoconstriction. These abnormalities cause intrapulmonary shunting and ventilation-perfusion mismatching, both of which contribute to the pulmonary gas exchange defects commonly observed in cirrhotic patients. This condition is termed hepatopulmonary syndrome (HPS) in the absence of detectable cardiopulmonary disease. Recent evidence has suggested that the dysregulation of the vascular endothelium plays a fundamental role in the altered vascular tone associated with liver cirrhosis. Moreover, the relationship between plasma concentrations of vasoactive factors and the severity of chronic liver disease have not been fully studied. The aim of this study has been to measure plasma levels of endothelin (ET)-1, Big-ET-1, nitric oxide (NO), adrenomedullin (AM), atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and dendroaspis natriuretic peptide (DNP), in patients with different clinical status of hepatic dysfunction according to the Child-Pugh classification. We studied 37 patients: 9 in class A, 15 in class B and 13 in class C (Child's C = the most severe liver disease). None of them were affected by heart and lung diseases. Preliminary results (mean \pm SEM) are the following:

Parameter	Class A	Class B	Class C
ET-1, fmoli/ml	0.69 \pm 0.24	1.15 \pm 0.39	1.36 \pm 0.44
Big-ET-1, fmoli/ml	0.98 \pm 0.16	1.74 \pm 0.23	2.18 \pm 0.32*
NO, $\mu\text{moli/L}$	62.3 \pm 6.7	65.3 \pm 8.4	80.5 \pm 19.9
AM, pmoli/l	18.3 \pm 2.6	23.2 \pm 2.5	32.5 \pm 4.8
ANP, pg/ml	9.0 \pm 2.3	19.3 \pm 3.9	34.9 \pm 13.7
BNP, pg/ml	10.4 \pm 3.2	39.2 \pm 9.9	93.6 \pm 39.9
DNP, pg/ml	274.1 \pm 16.5	313.0 \pm 44.9	391.9 \pm 31.8

* $p=0.019$ class C vs. class A (Scheffe test after ANOVA)

Plasma concentrations of all the vasoactive peptides measured increased with the progression of hepatic dysfunction suggesting that these factors may contribute to dilation of pulmonary precapillary vessels. Their knowledge will allow us a better characterization of HPS.

Ref: Zhang M., Luo B, Chen S., Abrams G.A., Fallon M.B.: Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. Am. J. Physiol. 277: G944-G952, 1999.

EFFECTS OF ATORVASTATIN ON GONADAL AND ADRENAL STEROIDOGENESIS IN HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS

Santini S.A., Carrozza C., Lulli P., Zuppi C., Tonolo G.*, Musumeci S.*

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Servizio di Analisi Ormonali, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma. *Dipartimento di Farmacologia, Ginecologia e Ostetricia, Pediatria, Università di Sassari, Sassari

Atorvastatin is one of the most largely used statins in the treatment of hypercholesterolemia. Like the others 3-Hydroxy 3-methylglutaryl-coenzyme-A (HMG-CoA) reductase inhibitors, it reduces both intracellular cholesterol synthesis and serum cholesterol levels, thus having a potential negative impact on gonadal and adrenal steroidogenesis.

Aim of our study was to evaluate the effects of therapeutic doses of atorvastatin on gonadal and adrenal steroidogenesis in hypercholesterolemic patients.

We studied 20 type 2 diabetic patients (10 males and 10 females mean aged 60 ± 4 years) with total cholesterol of 244 ± 9 mg/dl, HDL cholesterol 42 ± 3 mg/dl and LDL-cholesterol of 160 ± 7 mg/dl. Blood samples were collected before and after a 3 month treatment with atorvastatin at 20 mg/die. No other drug was taken by patients for the time of the study. In all patients, serum cortisol, DHEAS, androstendione and SHBG were measured, with the addition, only in males, of testosterone and ITL.

No significant difference was found between these parameters before and after atorvastatin supplementation both in men and in women. No side effect was referred by the patients. Total cholesterol and LDL-cholesterol levels significantly decreased after statin treatment (188 ± 6 mg/dl and 119 ± 8 mg/dl, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), while HDL-cholesterol levels did not significantly change ($P = N.S.$).

In conclusion, our data demonstrate that the use of HMG-CoA reductase inhibitors, like atorvastatin, has no clinically meaningful effects on gonadal and adrenal steroidogenesis. Since humans are believed to derive the cholesterol necessary for steroid hormone synthesis mainly from LDL via receptor-mediated endocytosis through the LDL receptor, our results suggest the existence of functional back-up pathways of cholesterol delivery to the gonadal and adrenal glands for steroid synthesis, possibly via mechanisms similar to those of rodents (i.e. HDL receptor).

Dobs AS, Schrott H, Davidson MH, Bays H, Stein EA, Kush D, Wu M, Mitchel Y, Illingworth RD. *Metabolism* 49:1234-8, 2000. Effects of high-dose simvastatin on adrenal and gonadal steroidogenesis in men with hypercholesterolemia.

PLASMATIC LEVELS OF CARDIAC NATRIURETIC HORMONES IN HEALTHY ADULTS: EFFECTS OF AGE AND SEX.

Del Ry S., Maffei S., Prontera C., Maltinti M., Emdin M., Giannessi D., Clerico A.

Institute of Clinical Physiology, CNR, Via Moruzzi 1, Pisa, Italy

In order to study the relationships between sex hormones, aging, and circulating levels of cardiac natriuretic hormones (CNH) and to define reference values for atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) assays, we measured the plasma levels of CNH healthy adults divided according to age and sex. We studied 222 healthy subjects of both sexes (109 men and 113 women) with age ranging from 20 to 77 (mean age 43.9 ± 14.6 years). All subjects were non-obese and had normal arterial blood pressure; they were free from acute diseases, including asymptomatic heart disease (excluded by means of clinical and echocardiographic investigations). Plasma ANP and BNP were measured with two-site IRMA methods previously set up in our laboratory. The mean ANP value in healthy adult subjects of both sexes was 17.8 ± 10.9 pg/ml with no significant difference between men (16.7 ± 10.0 pg/ml) and women (18.8 ± 11.7 pg/ml). The mean BNP value in healthy adult subjects of both sexes was 9.9 ± 8.9 pg/ml with a significant difference ($p < 0.0001$) between men (7.7 ± 7.0 pg/ml) and women (12.3 ± 10.0 pg/ml). There was a weak, although highly significant, linear relationship between age and either ANP ($r = 0.338$, $p < 0.0001$) or BNP ($r = 0.257$, $p < 0.0001$) values. When the circulating levels of CNH, and age and sex were analyzed by multiple stepwise regression analysis, both age and sex significantly and independently contributed to the regression. Our study indicates independent positive effects of aging and female sex hormones on ANP and BNP levels in healthy adult subjects. These effects should be taken into account in the calculation of appropriate reference values for CNH assay. Our data also suggest that CNH may mediate some cardioprotective effects of female steroid sex hormones in women.

Ref: Clerico A, Del Ry S, Giannessi D. Measurement of natriuretic cardiac hormones (ANP, BNP, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods [review]. *Clin Chem* 2000; 46:1529-34.

VALUTAZIONE DELL'ANALIZZATORE ACCESS (BECKMAN COULTER) PER LO SCREENING PRENATALE DELLA SINDROME DI DOWN

Izzo F., Tozzi P.

Laboratorio Centrale Analisi Biochimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Careggi - Firenze

Lo screening prenatale per la Sindrome di Down basato sulla misura, nel siero materno, di alfafetoproteina (AFP), gonadotropina corionica (hCG) ed estriolo non coniugato (ncE), conosciuto come "triplo-test" è ormai entrato nella routine di molti laboratori. Risulta quindi interessante dal punto di vista organizzativo la disponibilità di strumenti in grado di effettuare in maniera totalmente automatica e sulla stessa provetta tutti e tre gli analiti richiesti. Nel caso del triplo test, l'inserimento di una nuova tecnica richiede anche un'attenta definizione, su di una popolazione di gravidanze normali, delle mediane delle concentrazioni dei tre analiti in corrispondenza delle settimane di gravidanza nelle quali viene effettuato il test. Tutto questo per poter disporre di tutti i parametri necessari al calcolo del rischio. Scopo del lavoro è la sperimentazione di uno strumento automatico per immunometria, basato sull'uso di un marcatore enzimatico a rivelazione in chemi-luminescenza, l'Access (Beckman-Coulter), che consente la misura contemporanea dei tre analiti. La sperimentazione ha riguardato la valutazione dell'imprecisione, della correlazione con i metodi in uso ed infine la definizione delle mediane.

Le prove di precisione sono state effettuate su due pool di sieri umani con diversi livelli di AFP, hCG e ncE, seguendo il protocollo NCCLS (EP 5-A). Le correlazioni sono state eseguite con i valori ottenuti dai metodi in uso su campioni a varie epoche gestazionali e precisamente: per AFP ed hCG immunometria in elettrochemiluminescenza (Modular E-340, Roche), e per ncE, radioimmunologia (Radim).

Le mediane, indicative, relative alle diverse concentrazioni degli analiti nelle settimane di gravidanza sono state calcolate rispettivamente alle settimane 15 (n=70), 16 (n=100) e 17 (n=30). Mediane definitive, da utilizzare nello screening richiederanno comunque un numero di campioni non inferiore a 200. Le prove di precisione hanno consentito di evidenziare un CV intra-serie che non ha superato il 5% per tutti e tre gli analiti ed un CV massimo inter-serie rispettivamente del 6.1% (ncE), 4.5% (hCG) e 4.2% (AFP). Le correlazioni hanno mostrato coefficienti rispettivamente di 0.84 (ncE), 0.92 (hCG) e 0.87 (AFP). Le buone prestazioni analitiche e la possibilità di eseguire i tre test sullo stesso strumento, con una ridotta manipolazione del campione in un tempo di circa 45', fanno apparire l'ACCESS una soluzione ideale per questi test esami che necessitano di una risposta affidabile e rapida.

IL LABORATORIO È ELEMENTO DIAGNOSTICO FONDAMENTALE NELLA DIAGNOSI DI MIELOMA MULTIPLO

Gaetani V., Tucci E., Procida E., Carosella R., Nubile G

Laboratorio analisi, A.S.L. Chieti, P.O. Ortona

Introduzione:

Il Mieloma multiplo (M.M.) è una neoplasia dovuta alla proliferazione incontrollata di un clone B-linfocitario; la sua incidenza annua è stimata in 3-4 casi per 100000 abitanti e colpisce per lo più maschi con età media di 60-65 anni, raramente al di sotto dei 40 anni. La diagnosi nei casi conclamati, si fonda soprattutto sul rilievo di plasmocitosi midollare superiore al 20% o di infiltrazione plasmocitaria istologicamente documentata. Pertanto alla luce di quanto descritto segnaliamo due casi di forme mielomatose che sarebbero sfuggite alla diagnosi senza il contributo sostanziale del laboratorio analisi.

Materiali, metodi e risultati

Sono arrivati alla nostra attenzione due campioni di sangue inviati dal reparto di Nefrologia con diagnosi di al ricovero rispettivamente di ritenzione urinaria e di sindrome nefrosica. Sono stati chiesti esami laboratoristici di routine tra i quali una elettroforesi proteica, che ha evidenziato nel siero la presenza di una componente monoclonale in zona gamma. A questo punto il laboratorio come suo iter procedurale, avendo riscontrato il risultato citato ha eseguito come secondo step la tipizzazione della componente monoclonale, con esito: IgG/k ed IgA/lambda; come terzo step la ricerca della proteina di BENCE JONES (catene leggere libere nelle urine) con esito positivo. L'elettroforesi proteica è stata eseguita su gel di agarasio tamponato in un mezzo alcalino (PH: 7,2) mentre la tipizzazione della banda monoclonale è stata eseguita con la tecnica dell'immunofissazione usando antisieri specifici anticatene pesanti gamma (IgG), alfa(IgA), e emme (IgM), ed anticatene leggere Kappa e lambda, mentre per le proteine BENCE JONES sono state eseguite con tecnica dell'immunofissazione su gel di agarasio tamponato a PH 8,8 utilizzando antisieri specifici anticatene pesanti gamma alfa e emme (trivalente) anticatene leggere e libere legate (kappa e lambda) utilizzano il sistema Hydrasis della ditta SEBIA. I due campioni in esame sono risultati quindi positivi per la proteina di Bence Jones e rispettivamente positivi alla tipizzazione IgG/kappa; IgA/lambda.

Conclusioni:

Pertanto la presenza di una componente monoclonale individuata occasionalmente senza relativo quesito clinico deve indirizzare verso la metodologia di analisi accurata citata, per giungere ad una diagnosi di certezza la dove non ci siano segni clinici che possano essere di indirizzo per M.M.

BIBLIOGRAFIA

Brody J et al myeloma and the myeloproliferative syndrome 1985

OMOCISTEINA E INDICATORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI CON EMICRANIA CON AURA

Ferraris E., Castellana C.N., Pini L.A., Nuzzo C., Pisa S., Poppi B.

Dipartimento di Medicina Interna, Servizio di Tossicologia e Farmacologia Clinica, Centro Cefalee, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

L'Iperomocisteinemia è considerata un fattore di rischio indipendente per prematura patologia cardiovascolare periferica, coronarica, cerebrale. Poiché sembra esservi una correlazione di tipo epidemiologico tra malattie cerebrovascolari e presenza di emicrania con aura, ci siamo proposti di valutare i parametri di rischio cardiovascolare di un gruppo di pazienti sofferenti di emicrania con aura (ECA) rispetto ad un gruppo di soggetti non emicranici sovrapponibili per sesso ed età.

La determinazione dell'omocisteina basale e dopo carico (metionina 100 mg/kg) è stata effettuata con metodo FPIA su strumentazione analitica Imx Abbott (tabella 1). Contemporaneamente sono stati dosati gli altri parametri di rischio cardiovascolare (lipidemici e coagulativi), vitamina B12 e Folati (tabella 2).

Tabella 1

	Basale	Dopo carico
ECA	11.08±3.57 ìmol/l	30.32± 9.27 ìmol/l
Controlli	12,8±6,01 ìmol/l	31,05±7,42 ìmol/l
P=	NS	NS

Tabella 2

	B12 pg/ml	Folati ng/dl	ApoA mg/dl	ApoB mg/dl	
*C	200-1000	2-17	102-215	59-155	
ECA	374.4±194.1	5.93±3.37	112.6±28.21	93.48±27.2	
	CHOL mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	TRIG mg/dl	Fibrinogeno mg/dl
*C	140-250	>55	0-150	fino a 175	200-400
ECA	206.72 ±38.9	54.7 ±13.4	119 ±39.7	94.5 ±40.3	278.86 ±41.03

*C=Controlli (range normale)

Nel campione esaminato non sono state riscontrate differenze significative dei valori di omocisteina tra pazienti con ECA e gruppo di controllo, così come non differiva in modo significativo la valutazione globale di rischio calcolata secondo la carta di Framingham. In particolare è da osservare che un solo paziente con ECA aveva valori nettamente superiori al range consigliato.

Bibliografia

G. Alftan, A. Aro, K. F. Gey (1997). The Lancet Vol 349, February 8
Pfeiffer CM (1999). Clinical Chemistry 45, No 1:152.153

MISURA DELLA DIGOSSINA SIERICA IN PRESENZA DI FAB ANTIDIGOSSINA CON TECNICA ACMIA SU DIMENSION RXL

Zoppi F., Masarin A., Marocchi A.

A.O. Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano

Quando si misura la digossina (DGN) sierica in presenza di Fab (frammenti leganti l'antigene digossina-specifici), somministrati quale trattamento specifico al paziente, essi possono produrre risultati analitici erratici, a seconda della tecnica utilizzata. Nel 1998 abbiamo presentato la nostra esperienza sulle strumentazioni Abbott TDx, Dade Behring Stratus, Opus, aca IV, Ortho Vitros 250. Il TDx misura la DGN totale (libera+legata dai Fab), gli altri la sola DGN libera.

La recente riedizione da parte della Dade Behring del metodo ACMIA (Affinity Chromatography Mediated Immuno Assay) sullo strumento Dimension RxL con modulo eterogeneo, ci ha indotto a valutare quale fosse l'effetto dei Fab su questa tecnica

Abbiamo analizzato sul Dimension RxL sieri addizionati di digossina, titolati, in crescendo, con Fab. Siccome una mole di Fab (PM 50 000 Da) lega una mole di DGN (PM 781 Da), si può calcolare la quota di DGN lasciata libera dai Fab aggiunti.

Gli stessi sieri sono stati ultrafiltrati per centrifugazione su Millipore-Amicon Centrifree e l'ultrafiltrato (UF) misurato sul Dimension. Siccome la DGN è legata alle proteine per il 20-40% e i calibratori del test sono in matrice proteica, le misure dell'UF sono state corrette in base ad una regressione ottenuta analizzando una serie di sieri di pazienti ed i relativi UF. La regressione è:

$$DGN_{siero} = 1,40 DGN_{UF} + 0,22 \mu g/L; r = 0,92; n = 20.$$

Le misure sperimentali ottenute sono state diagrammate in funzione della concentrazione di DGN libera calcolata, e confrontati con le diagrammazioni ottenute nei precedenti lavori. C'è un'ottima sovrapposizione tra i valori misurati (su siero e UF) dal Dimension con quelli attesi e con quelli ottenuti su Vitros 250 (siero e UF) e su TDx (solo UF). Status e Opus forniscono risultati più alti.

Commento al metodo ACMIA eseguito su aca IV. Se si segue per almeno 4 giorni l'andamento della concentrazione di DGN libera dopo il trattamento con i Fab, si osserva uno scostamento verso concentrazioni più elevate, rispetto agli altri metodi, dei valori dell'aca IV. Si può ipotizzare che, nel tempo, s'instauri una competizione tra i F(ab')₂ coniugati del reagente e i Fab del siero del paziente. L'emivita plasmatica dei Fab è più breve di quella della DGN ed essi sottostanno ad un intenso metabolismo, che ne diminuisce l'efficacia di legame. Viceversa i F(ab')₂ mantengono sempre la stessa avidità sottraendo così DGN al suo legame con i Fab. In questo modo viene simulata una concentrazione più alta di DGN libera. Poiché il "format" di reazione è lo stesso, si può ipotizzare che la misura della DGN libera con il Dimension si comporti nello stesso modo.

DOSAGGIO DELLA NORBUPRENORFINA IN HPLC: LIMITI E VANTAGGI NELL'UTILIZZO PER I SERVIZI PER LE FARMACODIPENDENZE

Cangiano G.¹, Manera B.¹, Cimmino A.¹, Siconolfi M.², Stimolo R.², Esempto C.², D'Amora M.³, Vrenna L.¹

ASL NA 1: ¹Dipart. Farm. – Lab. Tossicolog. Riferim. Territoriale; ²SERT – Distretto 50; ³Responsabile Area Medicina di Laboratorio. e-mail: giocangiano@libero.it

La Buprenorfina (BUP) può, in alcuni casi, risultare una valida alternativa al trattamento metadonico in quanto riduce il livello di dipendenza fisica del Paziente e la gravità dei sintomi di astinenza alla sua sospensione. Il dosaggio urinario della norbuprenorfina (NORBUP), corretto con quello della creatinina, può essere utile nella valutazione della congruità delle dosi di farmaco e nel monitoraggio della compliance del Paziente afferente al SERT. L'utilizzo di diverse posologie e la richiesta di quantificazione urinaria ha indotto il nostro laboratorio a ricercare un test rapido e più efficace rispetto a quello effettuato con tecnica RIA. Col presente lavoro si propone un nuovo metodo per dosare NORBUP in cui è prevista l'idrolisi enzimatica del campione urinario e la successiva corsa cromatografica in HPLC effettuata col sistema Remedi-HS della ditta Bio-Rad. In un intervallo analitico compreso tra 80 ed 8000 ng/mL di NORBUP, si riscontra un profilo di imprecisione con CV% <3% ed un recupero % compreso tra il 98,9 ed il 126,3%. Le prove di precisione nella serie (n=20) e tra le serie (20 giorni lavorativi) mostrano CV% rispettivamente inferiori al 3% ed al 5%. Contenuti di NORBUP inferiori ad 80 ng/mL, riscontrati in buona parte dei pazienti in trattamento con 1 mg di farmaco (Subutex), vengono rilevati sottoponendo il campione idrolizzato ad una estrazione in fase solida (resa del 73,7%); concentrazioni inferiori a 22 ng/mL saranno determinate in RIA od in GC-MS. Lo studio effettuato su circa 1500 campioni di urine appartenenti a pazienti in terapia con dosi da 1 a 20 mg/die ha evidenziato una discreta corrispondenza tra i dosaggi di NORBUP (ng/mL), "corretti" con la creatinina urinaria (mg/mL), e la dose somministrata (mg). Vengono pertanto proposti i seguenti intervalli di riferimento:

dose - NORBUP/creat.	dose - NORBUP/creat.
2 64 – 230	4 121 – 504
6 195 – 712	8 280 – 925
10 412 – 1198	12 584 – 1363
14 762 – 1604	16 900 – 1930
18 1220 – 2304	20 1410 – 2725

Il sistema Remedi-HS non riesce a discriminare NORBUP in presenza di sostanze aventi tempi di ritenzione simili (es., alcuni metaboliti di antidepressivi) ma ha il vantaggio di identificare contemporaneamente altre sostanze psicotrope e rivelare presenza di BUP (adulterazione o errata somministrazione).

Cangiano G., D'Amora M., Manera B. e Al. Dosaggio cromatografica della buprenorfina: dati preliminari. Atti XIV Congr. Internaz. Biologi. Altavilla Milicia. 2001

VALUTAZIONE DELL'UTILIZZO DEI TEST ANTIADULTERAZIONE NELLO SCREENING DELLE SOSTANZE D'ABUSO SU URINE

Castellana N., Pisa S., Nuzzo C., Poppi B., Trenti T.*

Struttura Complessa di Tossicologia e Farmacologia Clinica, Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena, via del Pozzo 71, 41100 Modena. *Servizio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, 41026 Pavullo n.F.(Modena)

Uno degli aspetti critici per escludere l'adulterazione delle urine nella determinazione delle sostanze d'abuso è rappresentato dalla misura nelle urine di creatinina, pH e peso specifico che devono rientrare in valori considerati fisiologici. Di recente è stato proposto di valutare la presenza di sostanze chimiche assunte o aggiunte per mascherare la presenza di droghe, misurando nitrati e cromati. Lo scopo della ricerca è stato di valutare i risultati ottenuti determinando questi nuovi parametri (nitrati e cromati) quando presenti, in rapporto a quelli più comunemente utilizzati (pH, peso specifico e creatinina urinaria). Sono stati valutati 1471 campioni provenienti dal Sert di Modena nell'arco di un mese. La determinazione di nitrati, cromati, pH e peso specifico è avvenuta utilizzando lo strumento ILAB 600 della ditta IL con reagenti forniti dalla Ditta Microgenix e metodica EIA. La determinazione della creatinina è stata effettuata con reattivo della ditta IL e metodica EIA. Per quanto riguarda la determinazione di nitrati e cromati non è stato rilevato nessun dato positivo, confermando come, almeno nella popolazione dei tossicodipendenti modenesi, non vi sia l'utilizzo di questo tipo di adulterazione diffuso negli Stati Uniti. Di maggiore rilievo sono apparsi i dati riguardanti la misura della creatinina urinaria con la presenza del 3% di campioni con valori assolutamente non fisiologici (<20 mg/dl). Il peso specifico ha dimostrato la presenza di valori sospetti (<1010) nel 6,25% dei campioni. Si è evidenziata una notevole congruenza tra creatinina e peso specifico anomali. Uno solo dei campioni con creatinina e peso specifico non fisiologici si è dimostrato positivo nella determinazione degli oppiacei con un valore comunque leggermente superiore al cut-off (428 ng/ml vs cut-off di 300 ng/ml). Nessun campione ha evidenziato un pH tale da modificare le performances della metodica Emit utilizzata. In conclusione non vi sono indicazioni sull'utilità della determinazione dei cromati e nitrati nelle urine da sottoporre allo screening tossicologico, mentre appare di maggiore utilità la determinazione della creatinina e del peso specifico.

Bibliografia

Urry F.M. et al. J. Anal Toxicol 1998 Mar-Apr;22(2):89-95

AMFETAMINE E MDMA: CONFRONTO TRA DUE DIVERSE METODOLOGIE ANALITICHE

Marchioro L.^o, Bassetto F.^o, Dall'Olio G.*^o, Tedeschi L.[^], Castagna F.[^], Plebani M.^o.

^oServ. Med. Lab. Azienda Ospedaliera, Padova; *Lab. Analisi, Sezione Tossicologia, Osp. S. Bortolo di Vicenza; [^]U.O. Tossicologia Forense e Antidoping, Azienda Ospedaliera, Padova.

Scopo del lavoro: La metodologia EMIT II PLUS, specifica per amfetamina e metamfetamina, non dimostra una soddisfacente accuratezza per la ricerca di altri derivati dell'amfetamina, MDA e per MDMA. Volendo cercare una valida alternativa al metodo EMIT abbiamo eseguito una valutazione preliminare del metodo immunochimico KIMS per il dosaggio delle amfetamine (cut off 1000 ng/mL) in associazione anche del nuovo reagente ultrasensibile (cut off 300 ng/mL), specifico per MDMA.

Materiali e Metodi: Sono stati raccolti 70 campioni urinari di pazienti provenienti dal Ser.T di Padova; inoltre sono stati considerati 4 campioni controllo (VEQ U.O. Tossicologia Forense e Antidoping di Padova). Tutti i campioni sono stati processati, dapprima con metodica EMIT II PLUS a cut off 1000 ng/mL (Syva Company DADE Behring) applicata su Mega-Merck (DADE-Behring) e successivamente con metodo KIMS per amfetamine (cut off 1000 ng/mL) e per amfetamine/MDMA (cut off 300 ng/mL) (Abusscreen ONLINE-Roche) su analizzatore Hitachi 911 (Roche Diagnostics). Sono stati poi selezionati 10 campioni per le analisi di conferma con HPLC (REMEDI, Bio-Rad) e con GC/MS.

Risultati: I risultati ottenuti con le analisi di conferma:

	EMIT+/-	KIMS ₁₀₀₀ +/-	KIMS ₃₀₀ +/-
HPLC+(4)	2/2	3/1	4/4
HPLC-(6)	1/5	0/6	2/4
GC/MS+(7)	3/4	3/4	6/1
GC/MS-(7)	1/6	0/7	2/5

In particolare, per i due campioni risultati Falsi Positivi per KIMS₃₀₀, la metodologia HPLC ha evidenziato una probabile interferenza da farmaci non rilevata in GC/MS.

Conclusioni Questi primi risultati ci permettono di esprimere un giudizio positivo nei riguardi della metodologia KIMS, evidenziando l'efficacia del contemporaneo impiego dei due metodi a diverso cut off. La GC/MS resta comunque la metodica di riferimento, soprattutto per quei risultati che possono avere valenza legale.

Bibliografia: S. Rouse, K. Motter, et al. *An Abuse screen Online immunoassay for the detection of amphetamine in urine on the Cobas Mira Automated Analyzer*. Clin. Chem, 1991;37(6), 995.

L'ABUSO DELL'ALCOOL NEI CONDUCENTI DELLE AUTOVETTURE COINVOLTE NEGLI INCIDENTI STRADALI

Vodovà A., Bortolameolli G., Castellini A., Spitaleri A., Petermeier G., Cosio G.

Settore di Farmacocinetica, Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

L'incidente stradale è tra le cause di morte più frequente nei paesi a più elevato livello economico, uno dei fattori di rischio maggiori è l'abuso di alcool etilico. L'articolo 186 del Codice della Strada vieta la guida sotto l'influenza dell'alcool quando il tasso alcoolemico supera gli 80 mg/dl. Nel periodo di due anni - dal 1° gennaio 1999 fino al 31 dicembre 2000 - sono pervenute nel Settore di Farmacocinetica e Tossicologia del Laboratorio di Biochimica clinica dell'Ospedale di Bolzano 235 richieste da parte delle Forze dell'ordine (Carabinieri, Polizia Stradale, Polizia Municipale) della Provincia di Bolzano per la determinazione dell'etanolo nei campioni di sangue prelevati ai soggetti che si trovavano alla guida degli autoveicoli coinvolti negli incidenti stradali. Lo scopo del lavoro è la valutazione statistica dell'incidenza dell'abuso dell'alcool nei conducenti degli autoveicoli coinvolti negli incidenti stradali.

I campioni sono stati analizzati con due metodi: metodo REA (attenuazione dell'energia radiante) e con metodo di gascromatografia a spazio di testa (il metodo di riferimento internazionale).

Complessivamente sono stati eseguiti 235 dosaggi di alcool etilico. Il 33% dei soggetti (n°77) erano sotto il limite stabilito dal Codice della Strada per la guida degli autoveicoli. Il 23% (n° 53) rientrano nella fascia tra 80 - 149 mg/dl (stato di ebrezza) e il 41% dei soggetti (n° 97) si trova nella fascia tra 150 e 300 mg/dl (stato di ubriachezza). 8 soggetti (3%) hanno avuto il tasso alcoolemico superiore a 300 mg/dl.

Concentrazione di etanolo in mg/dl	1999	2000	Totale
0 - 79	40	37	77
80 - 149	27	26	53
150 - 300	43	54	97
> 300	3	5	8

IL 67% dei conducenti degli autoveicoli, coinvolti negli incidenti stradali presi in esame, ha avuto una concentrazione ematica uguale o superiore a 80 mg/dl - limite del Codice della Strada attualmente in vigore.

BIBLIOGRAFIA: Bertol E., Mari F., Lodi F., Marozzi E.; Trattato di Tossicologia Forense