

RADIOIMMUNOASSAY OF ANGIOTENSIN II IN CONGESTIVE HEART FAILURE PATIENTS AND NORMAL ELDERLY SUBJECTS

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

CNR (National Research Council) Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Angiotensin II (AII), the hormone produced by the angiotensin converting enzyme from angiotensin I, is a powerful vasoconstriction agent which plays a central role in the regulation of blood pressure either in physiological or pathophysiological conditions, such as hypertension or heart failure. Plasma AII levels evaluation should give clinically useful information in cardiac patients. Unfortunately, direct radioimmunoassays in plasma samples are not suitable for AII measurement, due to the very low concentration of the hormone (few pg/ml) and to the interference of related peptides. Thus, AII radioimmunoassay (Bühlmann Laboratories AG, Switzerland) has been carried out in our laboratory, after sample extraction: EDTA plasma samples have been reversed phase-extracted using phenylsilylsilica columns and, afterwards, preincubated for a 16-hour period with an anti-AII antibody; then, I^{125} -AII, which competes with the hormone for the same antibody binding sites, is added to the mixture. After a second 6-hour incubation, a solid-phase second antibody is added and the precipitated bound fraction is counted.

In order to establish reference values, 18 samples from healthy elderly subjects (62 ± 3 years) have been assayed; a range from 1.8 to 16.6 pg/ml (mean value 6,95 pg/ml) was found. In 18 patients with congestive heart failure (60 ± 4 years, class NYHA II-III, left ventricular ejection fraction $< 35\%$) AII concentration ranged from 5.5 to 292 pg/ml (mean value 76.9 pg/ml, $p < 0.01$ vs. controls). A comparison between AII and PRA (Plasma Renin Activity estimated through the measurement of angiotensin I generated and assayed by RIA, Dia-Sorin, Saluggia, Italy), was performed on 51 patient samples: the range of values was 0.2-50.2 ng/ml/hr for PRA and 1.8-402 pg/ml for AII, respectively. Linear regression analysis gives $PRA = 0.12AII + 0.1$; $r = 0.87$.

VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO DI Ab-TPO CON SISTEMA ECLIA ELECSYS® ROCHE

Bettinsoli G., Caldinelli A., Zucchi M., Rossini P.L.

Serv. di Medicina Nucleare Spedali Civili, BRESCIA

PREMESSA: Recentemente è stata riportata una correlazione tra il titolo di Ab-TPO e l'insorgenza di patol. tiroidea in un gruppo definito di Pz. (Nohr SB et al. Postpartum thyroid dysfunction etc. J Clin Endocrinol Metab 85(9):3191-8,2000). **SCOPO:** valutare il sistema Elecsys per Ab-TPO. **METODI:** a) Anti TPO ECLIA - ELECSYS®: met. competitivo b) Anti-TPO RIA: met. competitivo (BIOCODE-Liege, Belgien, cod. BC 1018) val di rif: < 25 IU/mL, standard calibrato su MRC ST 66/387. c) TSH: metodo ECLIA (Roche) val rif 0.27-4.2 mIU/L; d) TBIAb: RRA (RSR Ltd Cardiff, GB), val. rif: < 14 U/l. **MATERIALI:** 1) ELECSYS 2010® ROCHE; 2) nr 5 pools di sieri (profilo di precisione inter-assay); 3) nr. 2 sieri di controllo (CT A, CT B) forniti con il kit Roche; 4) nr.60 sieri da donatori di sangue, di cui 30 M con età media: 42 aa (range 22-63), TSH: media: 1.2 mIU/L (0.23-2.11), e 30 F con età media: 38 aa (range 18-63); TSH: media 1.78 mIU/L (0.6-4.17); 5) nr 44 sieri di Pz con diagnosi di tiroidite a stadi diversi della malattia (4 M and 40 F); età media: 48 aa (14-78); tempo dalla diagnosi: media 3aa ($r < 1-15$); dei 44 Pz, 32 erano in terapia con L-T4: media 3 aa, (range $< 1-15$); 6) nr 42 Pz affetti da m.di Basedow a vari stadi della malattia, tutti con presenza di anticorpi anti Recettore del TSH nel siero (TBIAb) (range 34 U/l- > 405 U/l). 7) nr 55 sieri da Pz del Ns/ Lab. Tutti i sieri furono processati sul momento, oppure conservati a -20°C fino al momento del test. **RISULTATI:** precisione inter-assay; 2 lotti di reagente; $n=18$; periodo: 2 mesi; nr calibrazioni del test: 10.

	pool 1	CT A	pool 2	CT B	pool 3	pool 4	pool 5
IU/mL	14	20	46	88	137	300	419
CV%	18.2	10.6	10.7	4.9	6.8	7.1	9.2

Valori di riferimento: dei 60 donatori, 56 avevano anti-TPO < 100 IU/L (range $< 5-73$ IU/mL); 3 F avevano 340, 400, 443 IU/mL; 1 M aveva > 650 IU/mL.; questi 4 furono esclusi dai calcoli. Val. rif.: < 32 IU/mL (Val rif Roche: < 63 IU/mL). Correlazione RIA/ ELECSYS®; $n=96$ sieri (41 sieri dal gruppo 6° e 55 sieri dal gruppo 7° dei materiali): 26 e 69 risultarono "normali" e "alti", rispettivamente, con entrambi i metodi, usando i Ns/ val. di rifer.; 1 Pz esibiva 40 IU/mL con Elecsys e 22 IU/mL con met. RIA. Correlazione "normali": 96%; Correlazione "alti": 98%; Correlaz. totale: 99%. TPO-Ab in 44 Pz affetti da tiroidite: 38 Pz (=88%) avevano valori "alti" (range TPO-Ab: $48- > 600$ IU/mL); TPO-Ab in 42 Pz affetti da m. di Basedow con TBIAb positivi: 33 Pz (=79%) avevano valori "alti" (range TPO-Ab: $40- > 600$ IU/mL). **CONCLUSIONI:** La precisione interassay, la correlazione con il metodo RIA, la sensibilità clinica nel gruppo da noi testato mostrano che il sistema Elecsys per Ab-TPO può essere utilizzato con profitto nel Laboratorio Tiroideo automatizzato.

CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE IN "ECSTASY" CONSUMERS

Pacifici R., Zuccaro P., Farrè M., Pichini S., Di Carlo S., Bacosi A., Palmi I., Roset P.N., Ortuno J., Segura J., de la Torre R.

Laboratorio Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma
Department of Pharmacology, Institut Municipal d'Investigació Medica (IMIM), Barcelona, Spain

Recent studies have shown that acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) produced a time-dependent immune dysfunction in animals and humans. Cell-mediated immune response after the administration of two repeated doses of 100 mg MDMA at 4-hour intervals was evaluated in a randomised, double-blind and cross-over clinical trials conducted in 17 healthy male MDMA consumers. The lymphocyte immunophenotyping (T helper, T suppressor, T mature and B lymphocytes and natural killer cells) was performed by flow cytometric analysis. Peripheral blood mononuclear cells stimulation was assayed by a radiochemical method using phytohemagglutinin. Plasma MDMA and cortisol concentrations were determined by gas chromatography equipped with a nitrogen-phosphorous detector and fluorescence polarization immunoassay, respectively. When two MDMA doses were administered, the first 100 mg dose produced a decrease in the CD4/CD8 T-cell ratio of -0.5, a decrease CD4 proportion of -298.0 cell/ μ l, a reduction of lymphoproliferative response to PHA stimulation of -67.9%, and a increase of NK cells of 131.1 cells/ μ l (peak value). The second drug dose enhanced the effects induced by the first dose. In fact, 1.5 hours after the second administration CD4 T-cells and lymphocyte proliferative response to PHA showed a mean decrease of -401.1 cells/ μ l and -87.4% respectively, as compared with placebo. In contrast, the increase in NK cells showed a mean peak of 179.9 cells/ μ l. At 24 hours, statistically significant residual effects for all altered immune parameters in subjects treated with two MDMA doses in comparison with the single dose group and placebo were found. A single MDMA dose produced a mean increase in cortisol concentration at 2 hour after drug administration of 16.7+6.2 μ g/dL. A further plasma cortisol increase to 15.8+7.2 μ g/dL was observed at 2 hours after the administration of the second MDMA dose. Significant residual effects were observed for all the immune parameters as late as 48 hours after the second dose. These results show that repeated administration of MDMA extends the critical period following MDMA administration, already observed after a single dose, in which immunocompetence is severely compromised.

References

Pacifici R, Zuccaro p, Farre M, Pichini S, Di Carlo S, Roset PN, Ortuno J, Segura J, De La Torre R.
Ann N Y Acad Sci 914: 215-224 (2000).

DETECTION OF DLIF IN A DIGOXIN IMMUNOASSAY IN DIFFERENT CLINICAL GROUPS AND HEALTHY SUBJECTS

Bettinardi N., Arnaboldi E. *, Felicetta I. *, Provenzale L., Cariraghi G., Scardilli S., Maiavacca R. *

Analysis Laboratory, Sesto San Giovanni Hospital and
*Clinical Research Laboratory, ICP, Milan, Italy

Introduction Digoxin is one of the drug most widely used in current health care delivery; its determination is the only way to assess the impact of individual patient physiology and drug metabolism on the fate of digoxin administered. Digoxin measurement may be limited not only by substances unrelated to digoxin and digoxin metabolites that cross-react with digoxin antibody, but also by endogenous digoxin-like immunoreactive factors (DLIF) that may give false positive results on samples from nondigitalized subjects because of a cross-react with anti-digoxin preparation. Aim of this study was to evaluate DLIF in different clinical groups and in healthy subjects.

Methods The sensitivity of Immulite Digoxin assay (Medical Systems, Genoa, Italy) to interference by DLIF was studied in serum from 12 healthy subjects, and in 65 serum samples from pregnant women (n=21), newborns (n=10), pediatric patients (n=15), patients with chronic renal failure (n=10) and patients with liver disease (n=9); 3 samples of amniotic fluid were also tested for DLIF. All patients enrolled in the study had never received cardiac glycoside and spironolactone. Analytical performance and potential interferences by hemolysis, bilirubin and triglycerides were excluded in an our previous study.

Results The number of patients exhibiting detectable DLIF (greater or equal than 0.2 ng/mL) was: 0 in pregnant women, pediatric patients and amniotic fluid; 1 in newborns, patients with chronic renal failure or liver disease. No DLIF were detectable in healthy subjects (from 0 ng/mL to 0.02 ng/mL). Statistical analysis on different clinical groups versus healthy subjects didn't show significant difference.

Conclusion Comparing our results to data of literature, we observed that all the groups with condition commonly associated with increased of DLIF were also found in this study. Among the clinical groups tested, the newborns and the patients with liver or renal disease showed a relatively small frequency of DLIF. With regard to pregnant women, it is known that DLIF may be associated to hypertension, and we can't establish this condition in the group; thus, we consider inconclusive the result of them. In conclusion, the modest extent of DLIF interference make the method tested adequate in monitoring digoxin therapy.

References Valdes R. et al. Standards of laboratory practice : cardiac drug monitoring. Clin Chem 1998; 41:1096-1109

Bettinardi N. et al. Analytical performance of an automated chemiluminescence immunoassay for digoxin determinations. Ligand assay 2000; 5(3):210

FALSA POSITIVITÀ NELLO SCREENING PER MET. URINARI DI MET/AMFETAMINICI: UNA NOSTRA ESPERIENZA

Caracciolo F., D'Aquino M.L.*, Firmani M., Gelormini R.*, Riario Sforza G.

Laboratorio di Patologia Clinica O.C. dello Spirito Santo Pescara; *Laboratorio di Patologia Clinica P.O. Clinicizzato SS Annunziata, Chieti.

Scopo del nostro lavoro è ribadire l'importanza della integrazione di metodiche i.chimiche e cromatografiche nella diagnostica f.tossicologica clinica. Nel dicembre 2000 un giovane maschio di 22 anni si rivolgeva al Lab. di Pat. Clinica per eseguire una triplice ricerca dei met. urinari di sostanze d'abuso secondo quanto richiesto dalla Comm. Medica Locale deputata alla concessione delle patenti guida. Il primo screening per sostanze d'abuso in urine veniva eseguito su un ACA star (analizzatore della DADE Int.) mediante tecnica qualitativa i.enzimatica omogenea EMIT-Syva derivata. (1) Il test per met/amfetaminici risultava non negativo in due delle tre determinazioni (0.41 e 1.43 QUAL units rispetto al cut-off di 0.30). Si ipotizzava subito una possibile interferenza da Efedrina, simpatomimetico costituente uno dei principi attivi del farmaco ACTIFED la cui assunzione era stata dichiarata dal giovane in fase di raccolta dei campioni. Si decideva allora di ricorrere ad esami alternativi di diagnostica i.chimica: in primo luogo si verificava la negatività di ambo i campioni nella esecuzione di un test qualitativo per met/amfetaminici (OnTrak TesTcup 4 della Roche Diag.) basato sulla inibizione della cattura di microparticelle. Veniva quindi eseguita una valutazione semiquantitativa per met/amfetaminici su analizzatore INTEGRA700 della Roche Diag. (metodica KIMS con cut-off 500 ng/ml) che riportava un valore di 178 e 369 ng/ml per i due campioni in analisi. Infine si otteneva il definitivo riscontro della interferenza da Efedrina mediante HPLC seguita da rivelazione in UV effettuata sul REMEDI-HS della Bio RAD Lab. operativo dall'ottobre 1993 presso il Settore di F. Tossicologia del Lab. di Pat. Clinica dell'O.C. dello Spirito Santo di Pescara. Il caso testé riassunto rappresenta un tipico esempio delle problematiche analitiche insite nella esecuzione di screening per met/amfetaminici con impiego di metodiche i.chimiche. D'altro canto l'esistenza nella realtà della f.tossicologia cl. abruzzese di una consolidata tradizione di scambi di informazioni e di collaborazione operativa fra le varie realtà dei Laboratori (nel caso specifico Chieti e Pescara) ha consentito di risolvere rapidamente e senza ulteriori disagi per il cittadino un caso paradigmatico di falsa positività al test di I livello per met. urinari di sostanze d'abuso.

(1) C. Baccini, P. Zuccaro, R. Pacifici, E. Pistocchi, A. Mazzotti e S. Giardina - SOSTANZE D'ABUSO dal Trattato It. di Medicina di Laboratorio vol. II, 1993 Ed. Piccin.

LINEE CELLULARI DI NEUROBLASTOMA PER LA VALUTAZIONE DI NEUROTOSSICITÀ DA AFLATOSSINA B₁

Cacci E., Biagioni S., Augusti-Tocco G.

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma

L'aflatossina B₁ (AFB₁) è un metabolita prodotto da due funghi, *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*, contaminanti di alimenti derivati da cereali provenienti principalmente da alcune aree dell'Asia e dell'Africa. Il fegato è l'organo bersaglio d'elezione della micotossina ed eventi di tossicità acuta e cancerogenesi a carico di questo organo sono attribuibili all'esposizione ad AFB₁ (1); tuttavia la sua presenza è stata riscontrata in numerosi altri organi e tessuti (2), sistema nervoso incluso, ed una sindrome caratterizzata da encefalopatia (3) è stata descritta in casi di intossicazione da AFB₁. E' sembrato pertanto interessante indagare sulla neurotossicità della AFB₁ e sui possibili meccanismi che la causano. Precedenti osservazioni hanno dimostrato che l'AFB₁ interferisce direttamente con cellule neuronali causando un decremento della sopravvivenza dose-dipendente (4). Si è allora studiata l'azione della aflatossina sulla sintesi del DNA mediante esperimenti di incorporazione di [³H] timidina e/o la sua capacità di indurre danno cellulare prendendo in considerazione, quale parametro indicatore, l'alterazione dell'integrità delle membrane, valutabile per mezzo del rilascio dell'enzima LDH e l'esclusione del colorante ioduro di propidio.

I dati ottenuti dimostrano che l'aflatossina è capace di interferire precocemente con la sintesi del DNA, provocando dopo solo 8 ore di trattamento un significativo decremento dell'incorporazione di [³H] timidina e un'inibizione di incorporazione dell'80% a 24 ore. Viceversa sia il rilascio dell'enzima LDH che la marcatura con ioduro di propidio indicano comparsa di danno cellulare solo a tempi di esposizione maggiori (48 ore). Infine lo studio del ciclo cellulare condotto con analisi citofluorimetrica ha dimostrato che la tossina causa un accumulo delle cellule in fase S.

1) McLean M. and Dutton M.F., *Pharmac. Ther.* 65, 163, 1995.

2) Chao T.C. et al., *Journal of Pathology*, 164, 225, 1991.

3) Reye R.D.K. et al., *Lancet* II, 749, 1963.

4) Bonsi et al., *ATLA* 24, 533, 1996.

LABORATORY TEST AS MARKER OF TREND IN ILLICIT SUBSTANCE CONSUMPTION IN THE MODENA AREA

Castellana C.N., Ferraris E., Morelli G., Poppi B., Trenti T.*

Toxicology and Clinical Pharmacology Unit, Azienda Ospedaliera and *Clinical Pathology Pavullo N/F Ausl Modena, via del Pozzo 71, 41100 Modena.

This research is aimed at evaluating the pattern and trend in use of illicit drugs between 1996 and 2000 by the means of the result in drug urine tests obtained from SerT (Toxicology Services) and Hospital Wards. The 107302 performed tests were analyzed in this study. The substances evaluated were: opioids, cocaine and amphetamine.

The urine sample tests were requested to laboratory by SerT, Hospital Wards and Emergency Room of Modena area. The laboratory applied an homogeneous enzyme immunoassay method (EIA analyzer ILAB 600 with IL reagents) intended for use in the qualitative and semiquantitative analysis of drugs in human urine.

The rate of positive for opiates was 17.2% in 1996, 20.1% in 1998, 16% in 2000 in SerT samples; 43.8% in 1996, 33% in 1998 and 14% in hospital ward samples; 61.3% in 1996, 39.2% in 1998 and 32% in 2000 in emergency room samples. Heroine use continues maintains the largest and stable impact of illicit drugs in the SerT samples, but the decreased rate of positive urine samples in the Hospital Wards and Emergency Room suggests that a new level of heroine use has been established. The outstanding date is relate the increase in the rate of positive for cocaine and amphetamine during the considered time. The rate of positive for cocaine metabolites was 1.2% in 1996, 6.1% in 1998, 8.9% in 2000 in SerT samples; 5.1% in 1996, 12% in 1998, 13.4% in 2000 in hospital ward samples; 0% in 1996, 28% in 1998, 24.6% in 2000 in emergency room samples. The same trend was shown in the case of positive amphetamine tests.

Heroine use continues maintains the largest and stable impact of illicit drugs in the SerT samples, but the decreased rate of positive urine samples in the Hospital Wards and Emergency Room suggests that a new level of heroine use has been established. The outstanding date is relate the increase in the rate of positivity for cocaine and amphetamine especially in Hospital Wards as well in Emergency Room during the studied time. These results show a strong increase in non-opioids drug abuse mainly due to cocaine and amphetamine. These data suggest that laboratory may play a specific role in the critical interpretation of illicit drug consumption and new professional skills in Emergency Room to manage the acute intoxications of cocaine and recreational drugs (Ecstasy) are requested.

THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF MYCOPHENOLATE MOFETIL IN KIDNEY TRASPLANT PATIENTS

Ferraris E., Morelli G., Nuzzo C., Castellana C.N., Trenti T.*

Toxicology and Clinical Pharmacology Unit Azienda Ospedaliera and *Clinical Pathology Pavullo N/F, Ausl Modena, via del Pozzo 71, 41100 Modena.

The role of mycophenolate (MMF) Therapeutic drug Monitoring is to be established. Nevertheless it is suggested a Therapeutic range from 2 to 3.1 microg/ml as a through level, it is proposed a drug flat dosage of 500 mg t.i.d.(CellCept; Roche)(1). The aim of the present research is to investigate the number of patient with plasma MMF values out of the range to support the need of a Clinical management based on MMF TDM (2).

472 transplant patients plasma samples (Department of Nefrology) were analysed between 01.01.1999 and 06.01.2000 by Laboratory. A validate analytical method was used for MPA measurement (metabolite of MMF) in plasma concentrations (EMIT immunoassay on analyser VIVA by Dade-Behring).

We divided the 472 blood specimens obtained after renal transplantation into three groups. The evaluation of patient samples showed the following results: 113 in range (23.94%), 150 under range (31.77%) and 209 above (44.27%). In Clinical practice, the analytical data of TDM are utilised in a drug adjustment decision making regarding individualisation of MMF dosing only in these cases of unjustified creatinine's increase and side effects occurrence Adoption of TDM for MMF in transplantation is presently uncertain, the presented data highlight that only 23.94% of patients is in the suggested Therapeutic range. In this light mycophenolic acid's TDM may be helpful in the management of patients considered at high risk for acute allograft rejection and as this immunosuppressive drug is taken chronically by transplant patients hematologic and gastrointestinal toxicity may be a consequence.

REFERENCES

1. Hale, MD et al. (1998) *Clinical Pharmac Therap*; Vol 64, No. 6
2. Yatscoff, RW et al. (1998) *Clinical Chemistry*; 44:2, 428-432

EMIT®MICOPHENOLIC ACID ASSAY EVALUATION
ON THE VITALAB-VIVA ANALYZER

Castellana C.N., Gallesi D., Nuzzo C., Ferraris E., Morelli G.,
Cavallini V., Trenti T.*

Toxicology and Clinical Pharmacology Unit, Azienda
Ospedaliera and *Clinical Pathology Pavullo N/F, Ausl*
Modena, via del Pozzo 71, 41100 Modena

Several reports highlight the importance of Mycophenolic
Acid's Therapeutic Drug Monitoring in patients receiving
renal transplants. This test takes a leading role to plan out
the patient's suitable therapy and warrant the best balance
between therapeutic efficiency and side effects (1).

As the comparative data between Mycophenolic Acid Emit
Assay and HPLC dosage seem acceptable, we evaluated
the possibility to apply the Emit method on the Vitalab-
Viva analyzer (Dade- Behring) through the evaluation of
instrument's performances (check up and serum control) (2).
The calibrator and the control samples utilized were
obtained by synthetic matrix like human plasma by
gravimetric process (Dade Behring). The range is between
0.1 e 15 µg/ml (sensitivity 0.1 µg/ml).

The method's precision was evaluated by the media and
the standard deviation of three different level controls
(low 0.5-2.0 µg/ml, medium 5.0-10.0 µg/ml, high 10.0-
15 µg/ml).

The results obtained at target concentration of 0.5-2 µg/
ml for the intra-day and inter-day repeatability were
respectively: mean 1.2 µg/ml, DS 0.1, CV 10.9% and mean
1.1 µg/ml, DS 0.1, CV 9.4%.

At target concentration of 5-10 µg/ml the results obtained
respectively for intra-day and inter-day repeatability were:
mean 11.4 µg/ml, DS 1.2, CV 10.2%, and mean 8.5 µg/ml,
DS 1.2, CV 13.7%.

At target concentration of 10-15 µg/ml we obtained
respectively for intra-day and inter-day: mean 14.9 µg/ml,
DS 1.2, CV 8.1%, and mean 12.2 µg/ml, DS 1.7, CV 13.7%.
The control's repeatability gave a mean value for each level
into the expected values. The CV of the three levels during
the 23 days analyzed was about 10%, an acceptable value
in the immunometric assays.

The system was considered validated for tests on human
samples.

1. Randall E. Morris (1995). *Ther Drugs Monit.* 17: 564-
569.
2. Schutz E et al. (1998). *Trasplant.Proc.* 30: 1185-1187.

LIVELLI PLASMATICI E TESSUTALI DI
DOXORUBICINA DOPO SOMMINISTRAZIONE
INTRAPERITONEALE: INFLUENZA DEL TNF-α

De Paoli M.¹, Quintieri L.², Rosato A.², Rossi C.R.³,
Scalera R.³, Varagnolo M.C.¹, Zanollo P.²

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera,
Padova

²Sez. Oncologia, Dipartimento di Scienze Oncologiche e
Chirurgiche, Università di Padova

³Clinica Chirurgica II, Dipartimento di Scienze Oncologiche
e Chirurgiche, Università di Padova

Studi clinici condotti in pazienti affetti da carcinomatosi
peritoneale e sottoposti a chirurgia citoreduzione seguita
da chemio-ipertermia intraperitoneale, hanno dimostrato
che il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α) è in grado
di incrementare significativamente la diffusione del
cisplatino nella circolazione sistemica.

Allo scopo di valutare l'eventuale influenza del TNF-α
sull'assorbimento di DX dopo somministrazione
intraperitoneale (i.p.), topi femmina del ceppo BALB/c
(n=15) sono stati inoculati i.p. con 6 µg di TNF-α umano
(Beromun®, Boeringer Ingelheim) e, a distanza di 30 min.,
con DX (Pharmacia Corp.; 6 mg/kg i.p.); animali di
controllo (n=15) hanno ricevuto la sola DX. A diversi
intervalli di tempo si è proceduto al sacrificio degli animali
e al prelievo di plasma e di alcuni organi (polmone, fegato,
piccolo intestino, milza, cuore, rene) utilizzati
successivamente per la determinazione quantitativa della
DX utilizzando un metodo HPLC con rilevazione
fluorimetrica messo a punto nel nostro laboratorio. Nel
plasma, la DX è risultata dosabile, in entrambi i gruppi
sperimentali, sino a 30 min.; i livelli plasmatici a 5 e 30
min. sono risultati nettamente più elevati negli animali
pretrattati con TNF-α ($t_5 = 0,317 \pm 0,042 \mu\text{g/mL}$ vs $0,195 \pm 0,032 \mu\text{g/mL}$; $t_{30} = 0,055 \pm 0,070 \mu\text{g/mL}$ vs $0,010 \mu\text{g/mL}$). Per contro, la somministrazione di TNF-α si è dimostrata in grado di ridurre marcatamente la captazione di DX da parte del tessuto intestinale nel quale i livelli di antraciclina sono risultati dosabili, in entrambi i gruppi sperimentali, sino a 24 h (controllo vs trattato con TNF-α: $t_5 = 2,277 \pm 0,280 \mu\text{g/mL}$ vs $0,677 \pm 0,612 \mu\text{g/mL}$; $t_{30} = 3,332 \pm 0,277 \mu\text{g/mL}$ vs $1,681 \pm 0,988 \mu\text{g/mL}$). Non è stata rilevata, per contro, alcuna differenza sostanziale fra i due gruppi sperimentali nei livelli epatici di DX. Infine, nel tessuto renale, cardiaco e splenico i livelli di DX sono risultati, in entrambi i gruppi sperimentali, al di sotto del limite di rilevazione.

Nel modello sperimentale considerato la somministrazione
i.p. di TNF-α appare dunque in grado di influenzare
sostanzialmente i livelli di DX nel plasma e in alcuni dei
tessuti studiati. Ulteriori esperimenti sono in corso al fine
di definire l'impatto di TNF-α sulla captazione tumorale
di DX in topi nudi portatori di neoplasia ovarica umana.

EFFETTO DEL FLUORURO DI SODIO E DEL DESAMETAZONE SU CELLULE (MG-63) OSTEOBLASTICHE UMANE IN COLTURA

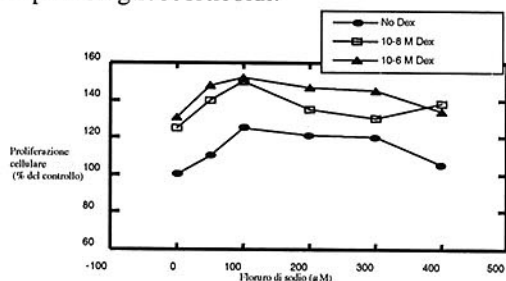
*Tresca E., *Savini F., *Della Pelle C., **D'Aquino M.L., **Gelormini R., *Nubile G.

* Laboratorio Analisi P.O. Penne – Pescara

** Laboratorio Analisi P.O. Chieti

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

Il presente studio dimostra che dosi di glicocorticoide possono potenziare l'effetto osteogenico del fluoruro di sodio dato per 24 ore a cellule osteoblastiche umane in coltura (MG-63). Nel nostro laboratorio, abbiamo osservato che il co-trattamento delle cellule osteoblastiche MG-63 con Desametasone (Dex) a concentrazioni comprese tra 10^{-10} e 10^{-6} M, aumenta significativamente l'effetto del fluoruro di sodio sulla proliferazione (Figura). Il Dex a concentrazioni comprese tra 10^{-10} e 10^{-6} M ha un effetto inibitorio sulla proliferazione delle MG-63. Il fluoruro di sodio usato ad una concentrazione di $100\mu\text{M}$, aumenta significativamente il numero cellulare ($+38\%\pm 2$) ($P<0.05$) rispetto alla popolazione di controllo. Il Dex usato a concentrazione pari a 10^{-7} M, riduce il numero cellulare del ($-30\%\pm 4$) ($P<0.001$). Quando le cellule sono trattate contemporaneamente sia con il fluoruro di sodio che con il Dex, risulta significativamente aumentato il numero delle cellule dopo 48h ($+141\%\pm 6$) (< 0.001). Questo risultato indica per la prima volta che su cellule osteoblastiche umane in coltura (MG-63), il co-trattamento con glicocorticoide, potenzia l'effetto del fluoruro sulla proliferazione cellulare, sulla differenziazione e sulla sintesi del collagene, presumibilmente attraverso differenti vie. Se questi dati venissero confermati in vivo, risulterebbe interessantissima, la possibilità di aumentare la formazione dell'osso nell'uomo usando in associazione con il fluoruro di sodio, bassissime concentrazioni di glicocorticoide. Questa ipotesi se confermata potrebbe ridurre notevolmente l'osteoporosi indotta nei pazienti sottoposti a lunghe terapie con glicocorticoidi.



J.R. Farley, J.R. Wergedal, D.J. Baylink (1983). Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science* 222:330-332.

STANDARDIZZAZIONE DELLE PROCEDURE PER LA DETERMINAZIONE DI LABORATORIO DELLE SOSTANZE D'ABUSO

De Stefano A.¹, Bracco G.¹, Pellegrino S.²

¹ Azienda Ospedaliera Santa Croce e Carle – Cuneo,

² Ospedale Mauriziano Umberto I – Torino,

Per conto dell' Assessorato Sanità Regione Piemonte.

In collaborazione con il Dott. Zuccaro P.- Gruppo di studio Farmacotossicologia Clinica e Doping – SIBioC

Con l'apporto operativo del gruppo di lavoro Progetto Tossicologia Regione Piemonte (Arcostanzo R., Arnelli A., Basili E., Bellomo G., Bianchi V., Goggi F., Marteletti M.T., Massacane R., Micca G., Moscato D., Patrucco G., Viarengo M.).

Nel campo della determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso, l'obiettivo è raggiungere modalità operative efficaci ed univoche, procedure omogenee nelle varie fasi del ciclo analitico, riproducibilità del dato analitico e della sua formulazione. Ciò ha comportato la necessità di uniformare le procedure analitiche, al fine di garantire comportamenti omogenei tra i Laboratori Analisi, con benefiche ripercussioni sia per gli operatori del settore che per gli utilizzatori del servizio. Tali considerazioni hanno spinto gli AA., nel febbraio 2000, a redigere ed a presentare, alla Commissione Laboratori dell'Assessorato della Sanità – Regione Piemonte, un Progetto di proposta di procedure per l'analisi delle sostanze d'abuso. Constatata la convergenza d'interessi sull'argomento, il Progetto è stato approvato.

Gli elementi salienti del Progetto prevedono:

1. la raccolta di dati epidemiologici e gestionali tramite questionari relativi alle analisi di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso inviato a tutti i laboratori della Regione Piemonte.
2. la rilevazione delle esigenze dei Ser.T in merito alle analisi in questione attraverso un questionario inviato a tutti i Ser.T della Regione Piemonte.
3. l'adozione di modalità operative comuni nelle varie fasi del ciclo analitico, ottenute tramite il confronto e la discussione operata da gruppi di lavoro su bozze di proposte per singoli argomenti, formalizzate con la stesura di Procedure.
4. una fase di applicazione-sperimentazione delle Procedure stabilite con evidenziazione di eventuali difficoltà applicative.
5. la stesura di Procedure operative definitive.

Gli obiettivi del Progetto sono stati raggiunti con l'adozione da parte della Regione Piemonte delle Procedure operative definitive.

LABORATORY EVALUATION OF THE ABBOTT AEROSSET DRUG OF ABUSE ASSAYS

Trenti T.*, Canali C., Pisa S., Ferraris E., Castellana C.N., Pini L.A.

Servizio di Tossicologia e Farmacologia Clinica Azienda Ospedaliera di Modena e *Patologia Clinica Azienda Ausl di Modena Pavullo N/F Modena

In drug of abuse screening the immunoassay results, expressed as quantitative, may provide a convenient measure of assay precision (1) and this approach appears to be feasible to evaluate and to validate the analytical performance of the Emit method (Dade Behring, Milan, Italy) for the analysis of cocaine metabolites, cannabinoids and methadone with the (Abbott) Aerosset analyser. The method's imprecision was evaluated by following the ECCLS (2) protocol utilising control samples S1 and S2. S1 sample with a target concentration for each drug below the cut-off intended as negative and S2 sample with a target concentration for each drug above the cut-off intended as positive. The calibrator (Dade Behring) samples were five for each drug with a point to point calibration. The calibrator and the control samples (Bio Rad, Milan, Italy) used were obtained by synthetic matrix like human urine by gravimetric process. Cocaine metabolites.

Intrassay			Interassay			
Mean (ng/mL)	SD	%CV	Mean (ng/mL)	SD	%CV	
S1	216	6.6	2.9	212	10.2	4.8
S2	363	9.1	2.5	356	19.5	5.4

Methadone

Mean (ng/mL)	SD	%CV	Mean (ng/mL)	SD	%CV	
S1	236	3.3	1.4	234	8.9	3.7
S2	356	11.8	3.3	343	20.2	5.8

Cannabinoids

Mean (ng/mL)	SD	%CV	Mean (ng/mL)	SD	%CV	
S1	33	1.9	5.7	32	2.9	8.8
S2	70	3.8	5.4	69	5.7	8.2

Calibration stability of at least 14 days was observed. The reported imprecision and stability results regarding performances on Abbott Aerosset Emit assay seem acceptable for analysis in drug of abuse.

References

1. Standefer JC et al. (1991) Clin. Chem. 37/5; 733-738.
2. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Guidelines for the evaluation of analysers in Clinical Chemistry, 3rd draft. Berlin: Beuth Verlag GmbH, ECCCLS document. Vol. 3, n2, 1986

SISTEMA DI VALUTAZIONE DEL PERSONALE: DALLA RISOLUZIONE DI UNA NON CONFORMITÀ ALLA ADOZIONE DI UN FONDAMENTALE STRUMENTO GESTIONALE

Zepponi E., Franchi B., Gentileschi E., Giuli M.L., Lauro L., Todaro G., Ursicino N., Giovannelli F., Tamagnini K.

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

Nel corso della visita del 3 maggio 2000 gli ispettori del Clinical Pathology Accreditation (CPA-UK) segnalavano la mancanza di un "Sistema di Valutazione del Personale". La direzione del laboratorio dopo una ricerca bibliografica decideva di adottare i parametri di valutazione proposti da P.B. Beaumont:

1. Conoscenza/abilità sul lavoro;
2. Adattabilità/flessibilità;
3. Produttività;
4. Qualità del lavoro;
5. Impegno nel lavoro;
6. Interazione con altro personale;
7. Originalità/iniziativa personale;
8. Intuizione;
9. Capacità di giudizio/corretto uso delle risorse;
10. Disponibilità e flessibilità nell'orario di servizio;
11. Conoscenza e rispetto delle norme di sicurezza;
12. Necessità di supervisione;
13. Capacità di supervisione;
14. Capacità di soddisfare obiettivi prestazionali.

Il personale ha condiviso l'adozione di questi parametri ed il fatto che la valutazione veniva proposta come un sistema per migliorare la politica dell'organizzazione nella gestione delle risorse umane.

La valutazione è di tipo semiquantitativo (Alta, Media o Bassa) a seguito di un colloquio del tipo "problem solving" orientato alla soluzione dei problemi e non al giudizio del singolo collaboratore che dovrà esprimere i propri limiti e proporre soluzioni per il miglioramento.

Considerando che il contratto di lavoro del comparto prevede obbligatoriamente la valutazione del personale e che essa aiuta la direzione del laboratorio a verificare aree di criticità, l'adozione del sistema di valutazione del personale suggerito dal CPA si è rivelata un'occasione di miglioramento della gestione globale del laboratorio.

Bibliografia:

1. Plebani M. Chiozza M.L. Sistema di valutazione del personale. In Sistema qualità ed accreditamento nel laboratorio clinico (II) - Aspetti applicativi - fascicolo 1°: Biomedica Source Books, 1998

"PICCOLA" ROUTINE IN AUTOMAZIONE

Rossi L., Lucchetti A., *Fagnani F., *Mariani S., Innocenti B.

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

Il nostro laboratorio esegue routinariamente una serie di esami particolari, numericamente poco incidenti nel totale degli esami della routine, ma che in termini di tempo richiedono un dispendioso impiego di personale, vuoi a causa di reazioni lunghe e di difficoltosa preparazione, vuoi per successivi e laboriosi calcoli facilmente fonte di errori. Il nostro obiettivo, ampiamente raggiunto, è stato quello di automatizzare i tests che richiedevano una fase pre e post-analitica manuale e di concentrare su un unico analizzatore le varie metodiche distribuite fino adesso su diverse apparecchiature di laboratorio, consentendo ad un unico operatore l'esecuzione di tali tests in un tempo molto più breve. Il sistema Modular (Roche Diagnostics) è l'analizzatore automatico di chimica clinica che ci ha permesso di ottimizzare l'organizzazione del nostro lavoro. Metodiche completamente manuali, come le LDL eseguite su gel di agarosio (Helena) sono state sostituite totalmente con nuova metodica LDL (Roche Diagnostics); aldolasi, acidi biliari (Bracco), ACE (Diacron), eseguiti con reazioni manuali colorimetriche sono state automatizzate senza modificare né il reattivo né la ditta produttrice grazie alla possibilità di creare sull'analizzatore metodiche aperte e personalizzabili in base alle esigenze; fosfatasi acida totale, albumina e lattato (Roche Diagnostics) sono stati trasferiti da altri settori del laboratorio (dosaggio farmaci) nel settore urgenze. Dopo aver valutato l'ottima concordanza di dati tra le metodiche manuali e quelle automatizzate, il passaggio a quest'ultime è stato immediato. Oltre a garantire ottime performance nel corso della seduta analitica, l'automazione ha inciso in maniera considerevole sulla fase pre-analitica evitando inutili pretrattamenti del campione, noiose diluizioni, lunghe incubazioni, e sulla fase post-analitica attraverso l'ottenimento di risultati immediati e definitivi, senza la necessità i calcoli manuali. Inoltre ha permesso l'inserimento quotidiano di controlli in ogni serie analitica, con la possibilità di memorizzare, richiamare, archiviare e controllare seconde le più suali carte di controllo di qualità nostri dati. L'ottimizzazione nell'esecuzione della piccola routine, ha permesso nel suo piccolo una ulteriore razionalizzazione nell'impiego del personale, introducendo nella routine giornaliera tests che per i problemi sopra menzionati erano destinati ad essere refertati in tempi lunghi e dipendenti dalla disponibilità di risorse per la loro esecuzione. Con l'introduzione, nel pannello degli esami di routine, di farmaci, droghe e sieroproteine, l'automazione e la flessibilità dei moderni sistemi analitici possono portare il laboratorio verso un miglioramento continuo dell'efficacia/efficienza del servizio fornito.

COMPARISON OF ORAL AND RECTAL ADMINISTRATION OF DICLOFENAC USING HPLC WITH SOLID-PHASE EXTRACTION

Paroni R., Arcelloni C., Fermo I., Perdercini S.*, Molteni G.*, Lanzi R.*

Laboratory of Separative Techniques and *Unit of Internal Medicine IRCCS H San Raffaele and School of Medicine, via Olgettina 60, 20132, Milano, Italy.

AIM. Aim of this study was to set up a sensitive and rapid HPLC method for Diclofenac (DIC) determination in human plasma (1). The method was used to compare DIC bioavailability after oral or rectal administration in healthy volunteers.

METHODS. Plasma samples (1 mL) were added with the internal standard ibuprofen (IBP) (20 μ L=100 μ g), HCl 7 mol/L (100 μ L), water (1 mL) and loaded onto the Absolut Nexus™ SPE cartridges (Varian, CA, USA) without pre-conditioning. After vacuum application by Visiprep Vacuum Manifold (Supelco, PA, USA), the cartridges were rinsed with 1-mL water followed by of 5, 20 and 40 % MeOH:water mixtures (1 mL each). DIC and IBP were recovered applying 200 μ L of methanol followed by 200 μ L of methanol:acetonitrile:ethylacetate (35:35:30, v:v:v). These washings were collected directly into the HPLC autosampler vials and 100 μ L were directly injected into the column. The analysis was performed on a RP C18 column (250 mm X 4.6 mm I.D., 5 μ m) (Merck, Germany) eluting at a flow-rate of 1 mL/min a mixture of KH₂PO₄ 25 mmol/L, pH 3.5:acetonitrile 30:70, v:v. The U.V. detector was set at 280 nm. At 8.00 AM, before breakfast, eight healthy volunteers (4 male and 4 female) aged 20-35 years were randomly assigned to receive either an oral (1 X 100 mg slow-release tablet) or a single rectal (1 X 100 mg suppository) administration of DIC. Blood was collected at time 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h. After 1-week wash-out period patients received DIC at the same dose but under a different administration way.

RESULTS. Retention times for DIC and IBP were 5.8 and 6.7 min, respectively. Linearity in plasma was good in the 5-80 ng/mL and in the 100-3000 ng/mL range ($r=0.999$). The limit of detection for DIC was 1.2 ng, while the limit of quantification was 5 ng/mL. Both DIC and IBP were quantitatively recovered from plasma while the intra-day imprecision at 100 ng/mL was 3.2% and the between day was 8.6% (n=5). The maximum concentration peak (C_{max}) occurred 1 h after oral administration ($1.9\pm 0.7 \mu$ g/mL) and 6 h after the rectal one ($0.6\pm 0.4 \mu$ g/mL). The AUC_{plasma}, however, were not significantly different by the two administration routes.

CONCLUSIONS. The method here propose proved to be useful to study pharmacokinetics of different DIC formulations, being sensitive, rapid, reproducible and with a high throughput of samples per day.

1) Paroni R., Fioravanti A., Fattorini L., Giordano C., Borghi C., Galli Kienle M., Marcolongo R. Curr. Therapeutic Res. 1991; 50:200-206.

CORTISOLO LIBERO URINARIO, HPLC, CLEAN-UP DEL CAMPIONE: ACCURATEZZA DI UN METODO DI DOSAGGIO

Scalise E., Papalia A., Rizzo V.

Dipartimento di Biochimica, Sez. Analisi Chimico Cliniche, Policlinico S. Matteo, P.le Golgi, 27100 Pavia

Il monitoraggio della frazione libera del cortisolo (idrocortisone) urinario viene considerato un test specifico e sensibile nella diagnosi e trattamento della funzionalità surrenalica, ipofisaria e ipotalamica.

Test immunologici (ECLIA e RIA) normalmente usati per la determinazione quantitativa del cortisolo plasmatico e/o sierico hanno dimostrato scarsa specificità per la quantizzazione del cortisolo nella matrice urinaria a causa di cross-reaction con sostanze interferenti (probabilmente metaboliti corticosteroidi).

Scopo del nostro lavoro è la valutazione dei livelli urinari di cortisolo libero in termini di sensibilità, specificità e riproducibilità mediante separazione cromatografica (HPLC) dopo selettiva estrazione liquido/liquido su fase solida (Chem Elut, Varian).

Pretrattamento del campione: 1 ml di urina (pH 5-6) contenente desametasone come standard interno, viene fatto adsorbire su colonna di estrazione. Il cortisolo viene eluito con 10 ml di diclorometano. Dopo evaporazione, il residuo secco viene ricostituito con 100 µl di fase mobile (tampone acetato 75 mM, 28 % acetonitrile, pH 6.5), 50 µl vengono iniettati su colonna cromatografica (Chromosphere 200x46 mm, Chrompack) e il cortisolo (R.T.= 10') e il desametasone (R.T.= 18.5') vengono rivelati a 254 nm di assorbanza.

Le performance analitiche del dosaggio sono le seguenti: limite di rivelabilità: 0.5 µg/l e 5.5 µg/l; linearità: fino a 1 mg/l recupero: 98±2% e 84.5±1.5%;; precisione nella serie: CV 2.5% e 2.9%; precisione tra le serie: CV 3.5% e CV 4.2% per cortisolo e desametasone, rispettivamente.

L'escrezione urinaria di cortisolo libero in soggetti sani di 28.10 µg/24 h (range 13- 53.7 µg/24h) ottenuta da 29 campioni di urine di bambini (5-12 anni) e di 78 µg/24h (range 26-212) ottenuta da 18 campioni di urine di adulti (45-65 anni) è comparabile con i valori ottenuti con altre tecniche specifiche (1).

I risultati ottenuti permettono di affermare che il metodo sviluppato risponde a severi criteri di accuratezza e può essere utilizzato nella routine di laboratorio e nella pratica clinica.

1) Inoue S. et al. J. Chrom.B, 661 (1994) 15-23

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEGLI ACIDI GRASSI A CATENA MOLTO LUNGA (VLCFA) NEL PLASMA MEDIANTE GAS-CROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA CON IONIZZAZIONE CHIMICA POSITIVA (GC/PCI-MS)

Bertucci P.¹, D'Ippoliti M.¹, Federici G.¹

¹Laboratorio Analisi, Ospedale Pediatrico – IRCCS "Bambino Gesù", P.zza S. Onofrio 4 – 00165 Roma

Nei mammiferi i perossisomi svolgono un ruolo preminente nel catabolismo di vari metaboliti, attraverso la via β-ossidativa. I substrati fisiologici sono rappresentati dagli acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA), dagli acidi dicarbossilici a catena media e lunga, da alcuni acidi grassi polinsaturi (come ad es. l'acido docosaesenoico, C 22:6). La determinazione quantitativa degli acidi grassi plasmatici totali a catena molto lunga (VLCFA) è uno dei più importanti criteri diagnostici per la caratterizzazione dei disordini perossisomali. I disordini perossisomali possono essere distinti in due grandi gruppi. Il primo gruppo è caratterizzato dalla perdita generalizzata delle funzioni perossisomali, come nella sindrome di Zellweger (ZS), nell'adrenoleucodistrofia neonatale (NALD), nella malattia di Refsum infantile e nella condrodisplasia rizomelica puntata (RCDP). Il secondo gruppo include disordini caratterizzati dalla perdita di una singola funzione perossisomale, come nell'adrenoleucodistrofia legata all'X (XALD) e nella pseudo-ZS. I pazienti affetti da queste patologie sono caratterizzati, in genere, da un aumento della concentrazione plasmatica dei VLCFA, principalmente il C 26:0 e dei rapporti C 24:0/C 22:0 e C 26:0/C 22:0. L'analisi dei VLCFA da plasma richiede un'estrazione con solvente (metanolo/benzene), un'idrolisi acida a caldo con acetilcloruro e con contemporanea metilazione, e l'aggiunta finale di una soluzione di K₂CO₃ al 12% per bloccare la reazione. Dopo una centrifugazione il sovranatante è recuperato, portato a secco e quindi risospeso in benzene per essere iniettato nel gas-cromatografo accoppiato allo spettrometro di massa. In questo modo è possibile separare, riconoscere e quantificare selettivamente i VLCFA, misurando le abbondanze degli ioni specifici relative ad uno standard esterno, di concentrazione nota, aggiunto inizialmente al campione (C 27:0). Questo metodo è molto riproducibile, nell'ordine del 2-4 % intra-day e del 4-6 % inter-day; i recuperi sono superiori al 90 % per ciascun acido grasso dosato; i dati analitici determinati da campioni di plasma di soggetti sani e pazienti sono completamente sovrapponibili con i valori normali descritti in letteratura (P<0.0001). Questo metodo è, inoltre molto sensibile, accurato ed economico, e richiede una procedura estrattiva relativamente semplice.

S-NITROSOGLUTATHIONE QUANTIFICATION IN HUMAN BLOOD

Pastore A.², Tozzi G.¹, Gaeta L.M.¹, Federici G.², Bertini E.¹, Piemonte F.¹

¹Molecular Medicine Unit and ²Laboratory of Clinical Biochemistry, Children's Hospital and Research Institute "Bambino Gesù", P.za S. Onofrio, 4, 00165 Rome, Italy.

Given the extreme liability and the facile inactivation of nitric oxide by many reactive biochemical species, S-nitrosothiol of glutathione (GSNO), which is the predominant low molecular weight thiol in cells, has been suggested to stabilize NO and preserve its biological activity. GSNO is a 100-fold more powerful antioxidant than GSH and exhibits a large spectrum of effects; furthermore, there is evidence in vivo for its neuroprotective action in brain (1,2). At the light of growing physiological relevance of GSNO, we analyzed 80 blood samples from healthy donors to detect endogenous GSNO. We developed a simple method based on HPLC separation and UV detection. A distinct peak is separated at pH 7, with a retention time of 3.0 min. Intra-assay CV was 3.0%; day to day CV was 8.7%; mean recoveries ranged from 40% to 99.6%. A linear relation was obtained between peak area and GSNO concentrations in the ranges studied. Correlation coefficient for GSNO was >0.99. The equation for the regression line (n=5) was $y = 1.3x - 0.33$ (where y is the peak area and x is the concentration of the analyte). The detection limit of the method calculated was 0.1 $\mu\text{mol/L}$. GSNO levels in 80 healthy subjects was 7.7 $\mu\text{mol/L} \pm 2.4$ and do not show any substantial changes with age and sex. GSNO was also analyzed in a subject affected by a neurodegenerative disease. Indeed, free radicals accumulation and oxidative damage have been proposed to contribute to neuronal death in some neurodegenerative diseases (18). GSNO concentration decreased at undetectable level in blood of this patient suggesting a possible role for GSNO in the study of the pathogenesis of neurodegeneration.

References:

1. Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASB J* 1998;12:165-73.
2. Chiueh CC, Rauhala P. The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res* 1999;31:641-50.

BLOOD GLUTATHIONE CONCENTRATIONS IN PEDIATRIC SUBJECTS

Pastore A.¹, Piemonte F.², Locatelli M.³, Lo Russo A.¹, Gaeta L.M.², Tozzi G.², Federici G.¹

¹Laboratory of Biochemistry, ²Molecular Medicine Unit and ³Scientific Directorate, Children's Hospital and Research Institute "Bambino Gesù", Piazza S. Onofrio, 4 - 00165 - Rome - Italy

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) is present in virtually all mammalian tissues; it provides reducing capacity and plays an important role in detoxification of peroxides and free radicals. The synthesis and degradation of glutathione take place by reactions of the γ -glutamyl cycle; a decrease in blood GSH concentration has been reported in patients affected by deficiency of enzymes involved in the synthesis of glutathione (1). Measurement of glutathione in blood samples is essential for the evaluation of the redox and detoxification status of cells in relation to its protective role against oxidative and free-radical-mediated cell injury; moreover, GSH measurement is important for the diagnosis of γ -glutamyl cycle disorders. Here we report a rapid and fully automated high-performance liquid chromatography method for determining total, reduced and oxidized glutathione in whole blood. Moreover, we report values of the different forms of blood glutathione in pediatric subjects.

CVs for repeatability of sample measurements were 0.5% for tGSH, 7.7% for GSSG, and 1.1% for GSH. CVs for reproducibility, as determined by assaying on 10 different days, were 2.8% for tGSH, 7.9% for GSSG, and 1.8% for GSH. The mean recovery ranged from 89 to 102.2% for GSH, and from 96.1 to 114% for GSSG. The limit of detection for standard samples, defined as the concentration that produces a signal-to-noise ratio >5, was about 50 nmol/L. A linear relation was obtained between peak area and glutathione concentration; the equation for the regression line (n=5) was $y = 0.504754x + 0.263365$ ($r > 0.99$).

Total, oxidized and reduced glutathione were determined in 227 healthy donors; blood concentrations of glutathione, expressed as median values and, in parenthesis, 95% confidence limit of the distribution, were: 8.0 (4.2-20.3) for tGSH; 0.82 (0.23-2.1) for GSSG and 7.1 (3-19.6) for GSH. Values are expressed as nmol glutathione/mg hemoglobin. No significant differences in blood glutathione concentrations were found between sex and age groups.

References:

1. Meister A and Larsson A. Glutathione Synthetase Deficiency and Other Disorders of the γ -Glutamyl Cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Eds. *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. McGraw-Hill: New York, 1989:855-868.

AN IMPROVED CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PLASMA CAFFEINE AND THEOPHYLLINE IN PRETERM NEWBORNS

Monteleone M., Martini A., Palazzo E., Dagna I., Leone L.

Laboratorio di Biochimica Clinica, Ospedale Infantile "Regina Margherita", Torino, Italy

We recently developed an ion-exchange chromatographic method for the quantification of plasma caffeine in preterm newborn and low birth-weight infants. The method was optimized to assay caffeine because, in our hospital, the pediatrics patients with neonatal apnea are treated with caffeine citrate or benzoate (10-20 mg at the birth, then 3-5 mg/die).

However, it is advantageous to assay theophylline together with caffeine because the former drug is an important metabolite of the caffeine in preterm infants (1) In order to obtain an optimized analytical performance to assay caffeine and theophylline in plasma of newborn infants, an isocratic ion-exchange HPLC method developed as follow. Samples (50 μ L) was denaturated with an equal volume of cold TCA 10% (p/v) and the resulting supernatant was injected (15 μ L) onto an ion-exchange HPLC column (Whatman Partisil 10 SCX, 250x4.6 mm i.d.). The mobile phase was Succinic Acid 0.04M:Acetonitrile [96:4 (v/v)] at pH= 2.8, at flow rate of 1.1 mL/min at room temperature.

The absorbance was monitored at 273 nm by a diode array detector. Theophylline eluted at 4.0 min and caffeine at 5.5 min. None chromatographic interferences from other commonly xantines and their metabolites was observed.

The calibration curve was linear for plasma concentrations between 1,25 – 50,0 mg/L ($r = 0.998$) for caffeine and between 1,83 – 60,0 mg/L ($r = 0.999$) for theophylline, with a limit of detection of 0.5 mg/L for the two compounds. The within- and between-run variations were determined (n=10). Intra-assay variation was: caffeine, mean 13.5 mg/L, S.D. 0.43 and C.V.3.1 %; theophylline mean 29,2 mg/L, S.D. 0.62 and C.V. 2.2%.

Inter-assay variation was: caffeine, mean 25.3 mg/L, S.D. 1.22 and C.V. 4,8 %; theophylline, mean 14.8 mg/L, S.D. 0.73 and C.V. 4.9%.

The method here described is fast, reproducibile and suitable for clinical studies, particularly for neonatal specimens. Actually, the method is used in our laboratory for many purposes: i) monitoring "routine" caffeine concentrations, ii) evaluate pharmacokinetic parameters in plasma of preterm newborns, particularly regard to the toxicity, iii) confirme the analytical theophylline results obtained by FPIA immunochemical method .

(1) Chow Lee T., Charles B., Steer P., Flenady V. and Shearman A., Clin. Pharm. Therap., 61,(6),628-640, 1997

PRESENTAZIONE DI UN NUOVO MODULO DI RICHIESTA DI ESAMI DI AUTOIMMUNITÀ

Roncaglia R.¹, Melegari A.², Tizzanini W.², Carbonieri A.²

1) Servizio di Medicina Trasfusionale Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena.

2) Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena.

Nel corso dell'anno 2000, è stato realizzato il Laboratorio della Diagnostica delle Patologie Autoimmuni, nato dalla unione delle risorse professionali e strumentali del Servizio di Medicina Trasfusionale e del Laboratorio Analisi Chimico Cliniche dell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena, ognuno dei quali copriva alcuni aspetti della diagnostica autoimmune. La creazione di questo unico polo diagnostico ha rappresentato l'occasione per una rivisitazione di tutto il percorso di richiesta degli esami. I criteri di revisione della nuova richiesta sono stati adeguati a garantire:

- l'appropriatezza e la razionalizzazione dei percorsi diagnostici
- il governo della richiesta di esami
- il miglioramento della organizzazione interna
- l'approccio informatico di prenotazione dei test

Il modulo di richiesta di esami costituisce un importantissimo canale di comunicazione tra il Laboratorio e i Reparti Ospedalieri e deve essere uno strumento utile ed efficace per la cui redazione è necessario un processo di riflessione e di valutazione di impatto sulla attività diagnostica.

Particolarmente questa esigenza risulta essere vera per gli esami di autoimmunità che oltre ad avere un costo organizzativo molto elevato, necessitano di una logica di esecuzione a cascata che il Laboratorio deve poter gestire sulla base di un corretto inquadramento clinico diagnostico. La nuova richiesta ha superato l'aspetto di pura e semplice elencazione di singoli test, trasformandosi in un modulo dinamico con maggiore compenetrazione tra clinica e laboratorio.

L'esperienza di diversi mesi di utilizzo del nuovo modulo di richiesta di esami ha evidenziato una maggiore attenzione e sensibilità da parte dei reparti richiedenti e una contrazione nella dispersione di esami richiesti con la possibilità di rivolgere gli approfondimenti necessari ai casi clinicamente significativi.

Riferimenti bibliografici:

- Durand-Zaleski I., Rymer JC., Roudot- Thoraval F., Revuz J., Rosa J. (1993) *Lancet*. Jul 17; 342 (8864): 150-3.
Henderson AR. (1982) *J. Clin. Pathol.* Sep; 35 (9): 986-98.

CA 19-9 IN PAZIENTI HCV+: VALUTAZIONE CLINICA E DI LABORATORIO

Castiglione C., Veronesi M., Pomante A., Della Pelle C., Tresca E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia AUSL di Pescara - P.O. "S. Massimo" Penne.

Il CA 19-9 è un marcatore tumorale utilizzato nella valutazione dei tumori pancreatici, gastrointestinali ed epatobiliari. Il CA 19-9 è espresso sulla superficie cellulare, prevalentemente delle cellule pancreatiche e dei dotti biliari. E' il marker di scelta del carcinoma pancreatico. In questo studio abbiamo voluto valutare le modificazioni della concentrazione del CA19-9 in 126 pazienti HCV+. E' stato utilizzato lo strumento AIA21 (Eurogenetics) che sfrutta il principio immunoenzimatico a competizione di legame. Abbiamo riscontrato concentrazioni di CA 19-9 superiori alla norma in 36 soggetti (28,5% del totale). Di questi 7 (30,7%) ($x=76,28$ U/mL) risultavano affetti da cirrosi biliare, 4 (7,7%) ($x=140,25$ U/mL) da epatite cronica attiva mentre i restanti 25 (61,6%) ($x=72,40$ U/mL) non presentavano segni biochimici di sofferenza epatica. L'ambito dei valori misurati oscillava tra 38 U/mL e 220 U/mL (v.n. fino a 37U/mL). Gli esami bioptici effettuati sia nei soggetti con cirrosi epatica che in quelli con epatite cronica attiva, non evidenziavano segni di evoluzione carcinomatosa.

Dai risultati del nostro studio e in accordo con altri autori, si evince che disordini epatici benigni possono determinare significativi incrementi di CA 19-9 che, si ipotizza, potrebbero essere ricondotti alla rigenerazione epatocellulare.

Questo studio conferma quanto sia indispensabile una notevole cautela nell'interpretare i valori dei marker tumorali di natura carboidratica. Poiché vari fattori possono contribuire ad incrementare i valori del CA 19-9 sarebbe auspicabile proporre differenti valori di riferimento per tale parametro.

Bibliografia:

- Collazos J., Genolla J., Ruibal A.- CA 19-9 in non-neoplastic liver diseases. A clinical and laboratory study - Clinica Chimica Acta, 210 145-151, 1992
- Maestranzi S., Przemioslo R., Mitchell H., Sherwood RA. - The effect of benign and malignant liver disease on the tumour markers CA 19-9 and CEA - Ann.Clin.Biochem 35,99-103,1998

CELIACHIA QUALE TEST PER UNA DIAGNOSI CORRETTA: LA NOSTRA ESPERIENZA

Valaperta S., Coslovich E., Lista S., Rondini L., Sabella S.

IRCCS Policlinico S. Matteo, P.le Golgi 2, 27100 PAVIA

La malattia celiaca è uno stato morboso che tende a regredire con una dieta priva di glutine, ne consegue che una diagnosi rapida e sicura è di fondamentale importanza per il paziente. Il laboratorio assume in questa diagnostica un ruolo primario.

Il nostro studio ha preso in considerazione 42 campioni di cui 16 appartenenti a pazienti positivi per celiachia (accertata con biopsia) e 26 negativi; tutti i campioni sono stati testati per la presenza di anticorpi anti endomisio con i seguenti metodi: IFI (Esofago di scimmia-Promesan), EIA (Bio-diagnostics LTD). I risultati sono riportati nella tabella 1.

TAB. 1:

EMA	IFI	EIA
POSITIVI	16	15
NEGATIVI	26	27
TOTALE	42	42

I due metodi hanno la stessa specificità (100%), ma la sensibilità del test EIA è del 94% contro il 100% del test IFI.

Sui 16 campioni positivi è stato eseguita la ricerca degli anticorpi antitransglutaminasi (test ELISA-IMMCO Diagnostics) e la ricerca degli anticorpi anti-gliadina di classe IgA (FEIA-Pharmacia Cap System). I risultati sono riportati in tabella 2.

TAB. 2:

EMA	tTg	AGA IgA
POSITIVI	15	10
BORDER	1	
NEGATIVI	0	6

CONCLUSIONI: La nostra esperienza, allo stato attuale, ci permette di considerare il metodo IFA su esofago di scimmia il test di elezione per una ricerca rapida e sicura di anticorpi anti-endomisio e quindi di diagnosi di celiachia. Il veto all'uso delle scimmie, che dovrebbe diventare operativo tra alcuni anni in Europa, ci pone non poche domande relative a quale test affidare in futuro questa importante diagnostica di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA: Cole, S.G., Kagnoff, M.F.: CELIAC DISEASE. Annu. Rev. Nutr. 5 : 241-266 (1985).

PROGRAMMA DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ (VEQ) IN IMMUNOMETRIA: VEQ IMMUNOSURVEY MEDICAL SYSTEMS

Piu M.*, Emanuelli B.°, Maggio A.*, Mazzocchi G.*

°Care Srl, Genova; *Medical Systems SpA, Genova

Un moderno schema di VEQ dovrebbe agevolare la partecipazione del maggior numero di laboratori alla valutazione di numerosi analiti, compresi quelli critici e di specialità. IMMUNOSURVEY, realizzato da Care e organizzato da Medical Systems, è un programma VEQ senza fini di lucro, ad adesione facoltativa. Da tempo impegnata sul fronte della qualità (1), Medical Systems è Membro EQALM (European Committee for External Quality Assessment Programmes in Laboratory Medicine). Dal 1987 al 1991 Medical Systems ha gestito il coordinamento italiano del programma UNIQC, realizzato in Euro/DPC dal Dr. G.Groom (organizzatore dal 1976 al 1987 dell'UK NEQAS e oggi Admin. Officer dell'Association of Clinical Biochemists, ACB UK). Sempre in collaborazione con Euro/DPC, Medical Systems ha gestito il programma ONCOSURVEY dal 1996 al 1998. IMMUNOSURVEY, attivato nel 1997, è nato come servizio gratuito di VEQ per gli utenti dei sistemi DPC IMMULITE® e AlaSTAT®; nel corso del 2000, peraltro, la partecipazione ad IMMUNOSURVEY è stata estesa ad ogni metodo di laboratorio. Oggi IMMUNOSURVEY costituisce il terzo VEQ nazionale, insieme ai programmi dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa (organizzati da Cis e Polymed) e dei Policlinici di Modena e S.Orsola-Malpighi di Bologna (organizzati dalla Regione Emilia-Romagna). Nel ciclo 2000 di IMMUNOSURVEY la partecipazione è stata di 508 laboratori italiani, dei quali 58% privati e 42% di istituzioni pubbliche; 36% sono i partecipanti del nord, 26% del centro e 38% del sud. Sono stati elaborati 73 parametri analizzati con 60 differenti metodi/sistemi di 33 produttori e 3 diversi software di rischio prenatale. Nella media, il numero di laboratori partecipanti/analita era 127; max 292. Metodi usati/analita: media 9, max 19. Risultati elaborati/analita: media 638, max 1569. CV medio/analita: media 17%, max 44%. Laboratori in I° Classe/analita: media 64%, max 100%. Il ciclo 2001 di IMMUNOSURVEY si articola in 12 profili con invio di 8 campioni/anno per profilo e consente di valutare circa 100 parametri. Sono contemplati livelli critici (es: hCG 2° trimestre: 10.000-80.000 mIU/mL); indici e risposte di rischio prenatale (trisomia 21, difetti del tubo neurale, trisomia 18); parametri ratio (es: F/T PSA, indici di Testosterone libero e di Estradiolo libero) e test esoterici (es: Osteocalcina, PTH, ACTH, Vitamina B12, Acido Folico, Eritropoietina, IL-2R, IL-6, TNF-alfa, Estriolo, SHBG, PAP, Ab anti-TPO, Ab anti-TG, ecc). Tutti i campioni sono forniti in provetta (tubo secondario) con barcode. E' possibile inviare le risposte tramite e-mail all'indirizzo veq@medicalsistemas.it. Prossimamente i partecipanti potranno interagire sul sito: www.veq.it.

(1) Maggio et al. *J Clin Ligand Assay Ed It* 1999. 21:83

NUOVE METODICHE PER LO STUDIO DEGLI EOSINOFILI IN SECREZIONI NASALI E LORO APPLICAZIONI CLINICHE

Granata S.*, Castelnuovo S.*, Mantini G.‡, Zanni D.°, Marocchi A.*, Ortolani C.#

*Lab. di Bioch. Clin. ed Ematologia, §U.O. Otorinolaringoiatria, °U.O. Fisica San., #Centro di Rif. Regionale per le Allergie - Niguarda Ca' Granda, P.zza Ospedale Maggiore 3, Milano

Scopo del lavoro è stato mettere a punto due metodi di prelievo di materiale di provenienza nasale (lavaggio e brushing nasale) che offrirono un ulteriore marker (gli eosinofili - EOS%) per valutare la natura delle riniti. Per alcuni pazienti abbiamo raccolto ulteriori parametri: eosinofili nel siero, dosaggio sul prelievo nasale di albumina, elettroliti ed ECP e grazie alla possibilità di consultare le cartelle cliniche anche i risultati dei test allergici cutanei (Prick Test) e sierici (Rast e Prist), sintomatologia, anamnesi e diagnosi. Abbiamo quindi messo in correlazione il risultato del metodo sperimentato con la clinica dei singoli pazienti. Dal 23/01/97 al 28/11/00, sono stati eseguiti 542 prelievi: 97 lavaggi e 445 spazzolati nasali. Abbiamo valutato la precisione nell'allestimento del vetrino (n°10 media EOS%=12.09 CV% 8,64) e il confronto tra due microscopisti valutando su 148 vetrini la correlazione $r=0,997$ $y=0,02+1,01x$. Abbiamo selezionato due gruppi di controllo, per i lavaggi, su 21 soggetti privi di patologia: gli EOS sono sempre assenti, mentre su 32 spazzolati in soggetti non allergici, ma con altre patologie del tratto respiratorio, abbiamo una media = 0,12 % ed un intervallo da 0 al 3%. Sono stati dosati alcuni parametri su 107 prelievi per chiarire la natura del materiale recuperato:

Albumina:	media 13.21mg/l, range ND-132
Sodio:	media 146.17mmol/l range 77.2-209.9
Cloruri:	media 137.11mmol/l range 67-186
Potassio:	media 0.42mmol/ range 0.1-3.2
Bicarbonati:	media 0.20mmol/ range 0.5-2.3
ECP:	media 13.25µg/l range ND-433.

Sono stati elaborati i dati degli EOS rispetto ad alcuni dati clinici con il test chi-quadrato. Per i lavaggi si osserva una relazione significativa ($p<0,1$) tra allergia e EOS, mentre per gli spazzolati, provenienti da pazienti che presentano tutte le manifestazioni allergiche, non esiste significatività; se nel gruppo degli spazzolati selezioniamo i soggetti solo con manifestazioni rinitiche otteniamo una netta correlazione con la presenza o meno di EOS ($p<0,1$). In conclusione la ricerca di EOS rappresenta un valido ausilio in quei pazienti dove la clinica od altri esami in vitro ed in vivo siano dubbi.

Bibliografia:

Lee H.S. et al. Quantitative Cytology of Nasal Secretion Under Various Conditions *Laryngoscope* 1993;103:533-537

VALUTAZIONE DI UN KIT PER INTERLEUCHINA 10 (IL10) E SUA APPLICAZIONE IN UNA POPOLAZIONE DI SOGGETTI TRAPIANTATI

Granata S.*, Castelnuovo S.*, Muti G.§, Busnach G.°, Marocchi A.*

*Lab. di Biochimica Clinica ed Ematologia, §U.O. Ematologia, °U.O. Nefrologia, Dialisi e Terapia del Trapianto Renale - Ospedale Niguarda Ca' Granda- P.zza Ospedale Maggiore 3 - 20169 Milano

Nei soggetti trapiantati viene registrata una percentuale del 5% di neoplasie. La patologia linfoproliferativa post-trapianto (PTLD) è una delle più frequenti ed è stata chiaramente riportata ad una eziologia virale. Dopo infezione da EBV, il virus permane latente nell'ospite. Nel 25-30% dei pazienti trapiantati sieropositivi sottoposti a terapia immunosoppressiva si osserva la riattivazione che induce le cellule B a trasformazione e proliferazione con quadri clinici che variano da forme asintomatiche fino a PTLD. Poiché, l'Interleuchina 10 (IL10) ha profondi effetti soppressivi sui macrofagi ed i T linfociti ed inoltre EBV genera un polipeptide analogo in struttura ed attività alla IL10 naturale, si è introdotto questo dosaggio per valutare i livelli di IL 10 naturale e vIL-10 codificata dal virus EBV (Kit Human ELISA IL-10 Endogen - Woburn- USA). Per valutare il metodo abbiamo eseguito prove di precisione nella e tra serie, di linearità, di recupero; abbiamo elaborato un intervallo di riferimento nei "normali" e valutato i CV tra le curve di taratura.

Precisione nella serie su 20 replicati espressa in %:

x= 8,7 pg/mL CV 11 ; x= 49,6 pg/mL CV 9,1

x= 184,7 pg /mL CV 7,2

Precisione tra serie su 16 replicati espressa in %:

x= 39,5 pg/mL CV 13,6 ; x= 228,3 pg/mL CV 13,3

La linearità è stata valutata sia sullo standard più elevato, sia su un siero di un paziente deceduto per una forma fulminante con valori di 110000 pg/mL; il recupero è stato valutato su 3 campioni A=108%, B=99% e C=106%. L'intervallo di riferimento da zero a 5,7 pg/mL è stato elaborato su un gruppo di dipendenti e volontari del laboratorio. Sulle singole assorbanze di alcuni punti delle curve, non sulle medie delle doppiette, eseguite dal 1999 al 2000 abbiamo calcolato i CV%; sullo standard basso (concentrazione=15,4 pg/mL- media assorbanze 58,7) abbiamo ottenuto un CV% del 29%, mentre sullo standard alto (concentrazione 600 pg/mL-media assorbanze 1595,8) abbiamo ottenuto un CV % del 18%. Dal 1998 alla fine del 2000 sono stati eseguiti 209 dosaggi con un intervallo da zero a 110000 pg/ml. Alcuni dei pazienti presentano dosaggi ripetuti nel tempo e apparentemente correlati all'andamento della patologia, ma per il momento il numero è troppo piccolo per poter essere statisticamente significativo.

Bibliografia:

Birkeland S.A. et al. Transplantation 1996;5:152-153

RISCONTRO DI ANTICORPI ANTI POLY (dT) NEI PAZIENTI NEOPLASTICI: UN LIMITE ALLA LORO SPECIFICITÀ VERSO LE CONNETTIVITI?

Brusca I., Li Vigni P., Sucato R., Genco R., La Chiusa S.

Servizio di Patologia Clinica, Ospedale "Buccheri La Ferla" F.B.F., Palermo

Introduzione. I radicali ossidrilici, chiamati in causa in molte malattie degenerative umane, sono anche conosciuti per agire sul DNA modificandolo soprattutto nei residui di timina ed adenina (ROS-DNA). Il DNA così modificato mostra una maggiore antigenicità, con una capacità di legame in vitro che può essere anche più di 50 volte superiore rispetto al DNA nativo. Il Poly (dT), DNA modificato nei residui di timina, è l' antigene sintetico maggiormente studiato ed è attualmente utilizzato nella diagnostica delle connettiviti. La presenza di anticorpi diretti contro i ROS-DNA è stata descritta in pazienti con neoplasie, probabilmente nel ruolo di markers di DNA danneggiato (1-2). Lo scopo del nostro studio è stato verificare la presenza di anticorpi anti poly (dT) in pazienti con neoplasie.

Materiali e metodi. Sono stati selezionati sieri afferenti al nostro laboratorio provenienti da pazienti con neoplasie ricoverati nel nostro ospedale. Su questi sieri sono stati determinati gli anticorpi antinucleo (ANA) e gli anti n-DNA (dati non mostrati) in Immunofluorescenza indiretta. Gli anti ENA (dati non mostrati) e gli anti poly (dT) con metodo immunoblotting (INNO LIA ANA, Innogenetics, Ghent Belgium). I sieri erano provenienti da pazienti con tumori tra il II ed il III stadio, in cui la malattia era alla diagnosi, che non avevano ancora subito interventi chirurgici e non avevano effettuato chemioterapia. Attualmente sono stati saggiati 32 sieri di cui 6 con Neoplasia della mammella, 5 con Neoplasia del colon-retto, 9 con tumori polmonari, 4 pazienti con Linfoma non Hodgkin, 3 affetti da Mieloma multiplo, 4 da cancro-cirrosi, 1 paziente da linfoma cutaneo. **Risultati.** Dei 32 sieri esaminati solo 4 hanno presentato anticorpi anti poly (dT), rispettivamente provenienti 1 da una paziente con tumore alla mammella, 2 da pazienti con tumore polmonare ed 1 da paziente affetto da cancro-cirrosi.

Discussione. I dati mostrati sono ancora preliminari, ma suggeriscono che gli anti poly (dT) sono raramente riscontrabili nei pazienti neoplastici, anche se rimane da verificare una possibile maggiore frequenza in alcuni tipi di tumore. La loro specificità nella diagnostica delle connettiviti pertanto non sembra essere particolarmente compromessa.

1. Ashok BT, Ali R. Binding of human anti-DNA autoantibodies to reactive oxygen species modified-DNA and probing oxidative DNA damage in cancer using monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1998 Nov 9;78(4):404-9
2. Ashok BT, Ahmad J, Ali R. Immunochemical detection of oxidative DNA damage in cancer and aging using anti-reactive oxygen species modified DNA monoclonal antibody. *Int J Biochem Cell Biol* 1998 Dec;30(12):1367-77

DUE METODI A CONFRONTO NELL'INFEZIONE DA CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Faricelli R., Lattanzio F.M., Iacovone C., Gioia S., Gambi A., D'Amico V., Rabottini S., Previti G., Di Palma A., Martinotti S.

Lab. di Patologia Clinica II, Ospedale Clinicizzato "SS. Annunziata", via Dei Vestini, 66100 Chieti

La *Chlamydia trachomatis* (C.T.) è un microrganismo intracellulare, si trasmette all'uomo sia per via diretta (attraverso contatto sessuale), sia per via indiretta. La C.T. è in grado di infettare un soggetto recettivo e di sostenere una patologia che può rimanere localizzata agli organi genitali o espandersi ad altri organi ed apparati a seconda delle condizioni immunitarie dell'ospite. La ricerca della C.T. nel nostro laboratorio è stata effettuata con due metodi:

- Ricerca diretta con tecnica di ibridizzazione molecolare su materiale biologico.
- Ricerca indiretta quantitativa di anticorpi specifici su siero.

Il test PACE 2 C.T. (Biomerieux) utilizza una sonda di DNA monocatenario, coniugata ad un marker chemiluminescente, che si complementa all'RNA ribosomiale dell'organismo eventualmente presente. Una volta avvenuta la reazione di ibridazione DNA-RNA il luminometro GEN-PROBE trasforma il segnale luminoso in segnale digitale che rivela la presenza del microrganismo. Gli anticorpi specifici vengono evidenziati in Fissazione del Complemento (F.C.) (SERAMAT DIESSE), che con metodo quantitativo permette di valutare gli anticorpi in presenza di complemento e globuli rossi di montone sensibilizzati con anticorpi emolitici specifici.

Al fine di valutare l'efficacia dei due metodi è stata presa in considerazione una popolazione di 40 pazienti, ricoverati prevalentemente presso la Clinica di Malattie Infettive. Dei 40 pazienti, 19 erano femmine e 21 maschi, con età media 38 anni per le femmine e 36 per i maschi. Su tale popolazione sono stati eseguiti contemporaneamente un prelievo ematico ed un tampone endocervicale per le donne, ed un tampone uretrale per gli uomini. Sul prelievo ematico è stata eseguita la tecnica di F.C., sui tamponi endocervicali ed uretrali è stata eseguita la tecnica di ibridizzazione degli acidi nucleici. Dei 40 campioni esaminati 3 (7.5%) concordavano positivamente e 37 (92.5%) negativamente in ambedue le metodiche. I dati ottenuti confermano che l'associazione delle due metodiche raggiungono una elevata sensibilità e specificità nella diagnosi di tale infezione. La ricerca dell'antigene nel tampone endocervicale e uretrale può essere così confermato dalla presenza degli anticorpi che hanno la loro importanza soprattutto nel monitoraggio dell'infezione.

Bibliografia:

Miettinen, *et al.*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995 June; 14(6):546-9.

DOSAGGIO DI ANTICORPI NELLA DIAGNOSI PRECOCE DI DIABETE DI TIPO 1 (T1DM)

Faricelli R.*, D'Amico V.*, Di Sciascio T.*, Di Sciascio M.B.*, Rabottini S.*, Martinotti S.*, Tumini S.***, Catino M.**

*Laboratorio di Patologia Clinica, **Clinica Pediatrica, Ospedale Clinicizzato di Chieti

Il T1DM è una malattia autoimmune cronica geneticamente determinata. I meccanismi immunitari sono alla base della comparsa dell'insulite. Assumono rilevanza clinica la diagnosi precoce per la prevenzione della chetoacidosi e la diagnosi differenziale con il diabete di tipo 2 dell'infanzia (MODY). Lo sviluppo del T1DM può essere predetto attraverso il dosaggio di uno o più anticorpi: anticorpi anti isole pancreatiche (ICA), anticorpi anti glutammato decarbossilasi (GAD), anticorpi anti insulina (IAA) e anticorpi anti tirosin-fosfatasi (IA-2A). Abbiamo evidenziato un incremento significativo del rischio di sviluppare la malattia in relazione al numero di autoanticorpi rilevati. Gli ICA sono un insieme di autoanticorpi caratterizzati dalla capacità di reagire con antigeni localizzati nel citoplasma delle cellule del pancreas endocrino. La metodica utilizzata per evidenziare gli ICA consiste nell'immunofluorescenza indiretta su sezioni di pancreas umano. Il GAD è un autoantigene identificato come l'enzima che catalizza la conversione dell'acido glutammico in acido gamma ammino-butirrico (GABA), viene dosato con metodo radioimmunologico. Il GAD 65 è quello presente nelle cellule beta dell'insula pancreatica umana quindi gli anticorpi anti GAD 65 sono gli anticorpi ricercati sia nei diabetici insulino dipendenti che nei soggetti a rischio. A tale scopo sono stati studiati, nell'arco di un anno, 135 soggetti, tutti in età pediatrica. A tutti sono stati effettuati gli anticorpi ICA di cui 8 sono risultati positivi, corrispondenti a circa il 10.8 % della popolazione considerata. Solo a 97 di questi soggetti sono stati effettuati gli anticorpi anti GAD 65 di cui 19 sono risultati positivi, corrispondenti a circa il 18.4% dei soggetti presi in esame. Solo 5 bambini sono risultati positivi sia per ICA che per GAD, corrispondenti a circa il 4.8 % di tutta la popolazione considerata. Tutti i pazienti positivi o per ICA o per GAD hanno sviluppato T1DM sia che avessero sia che non avessero familiarità diabetica. La valutazione degli autoanticorpi ha evidenziato un incremento del rischio di T1DM. Quindi la ricerca dei due autoanticorpi considerati fornisce un test dotato di una elevata specificità e sensibilità anche se con costi abbastanza elevati. Al momento però non disponiamo di mezzi alternativi e di efficacia certa per la diagnosi precoce di tale malattia.

		POS	%	SENS	SPEC
ICA	135	8	10.8	60 %	98.4 %
GAD65	97	19	18.4	100 %	92.8 %
Ica+gad	97	5	4.8	100 %	100 %

QUANTITATIVE ASSAY OF p53, THYMIDINE KINASE AND CATHEPSIN D IN 200 PRIMARY BREAST CANCERS

Greco S.¹, Marsigliante S.¹, Biscozzo L.¹, Elia M.G.¹, Macchia P.¹, Leo G.², Storelli C.¹

¹Laboratorio di Fisiologia Generale, Dipartimento di Biologia, Università di Lecce, Via Provinciale per Monteroni, 73100 Lecce; ²Laboratorio Analisi, Azienda Sanitaria Locale Lecce 1, Via Miglietta, 73100 Lecce.

We assayed levels of p53, cathepsin D (Cath-D) and thymidine kinase (TK) in 200 primary breast carcinoma cytosols using immunometric assays to evaluate the relationships. TK [1] Cath-D [2] and p53 [3] indicate a more aggressive tumour phenotype.

We assayed TK activities using a radioenzyme assay (Prolifigen TK), Cath-D and p53 concentrations by a immunoradiometric assay (IRMA) (CIS Biointernational) and a luminometric assay LIA-mat (AB Sangtec Medical), respectively. All the proteins were one another quantitatively correlated. In fact, TK activities were significantly correlated to concentrations of both p53 or Cath-D ($p=0.03$ and $p<0.0001$, respectively). Also p53 and Cath D concentrations correlated ($p=0.03$). TK activities were higher in Cath-D positive tumours compared with the Cath-D negative tumours ($p=0.003$). Accordingly, Cath-D concentrations were higher in the TK positive tumours than in the TK negative group ($p=0.0005$). Conversely, higher concentrations of Cath-D and activities of TK were expressed in p53 positive tumours, compared to those negative ($p=0.005$ and $p=0.03$, respectively).

These relationships might describe a tumour population of high proliferation activity and invasion potential, whose identification may be useful in defining prognosis.

1. O'Neill KL, McKelvey VJ, Hoper M, et al. Breast tumour thymidine kinase levels and disease recurrence. *Med Lab Sci* 1992; 49: 244.
2. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300.
3. Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 1995; 267: 1353.

AUTOIMMUNITÀ E MORBO CELIACO NELLE FAMIGLIE DEI DIABETICI TIPO I

*Rossi L., Fagnani F., Mariani S., Quilici S., Cinapri V., *Lucchetti A., *Mugnaini P., *Innocenti B., Giampietro O., Matteucci E.

Dipartimento Medicina Interna, Università di Pisa; *Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana - Pisa

La prevalenza del morbo celiaco nella popolazione adulta è sconosciuta a causa dell'esistenza di forme silenti e latenti. Il diabete mellito di tipo I può essere associato al morbo celiaco a causa della stessa origine genetica e/o dello stesso meccanismo patogenetico. Abbiamo studiato 74 adulti con diabete mellito di tipo I (32 ± 11 anni, durata di malattia 13 ± 9 anni), 69 genitori (56 ± 10 anni) e 59 fratelli non diabetici (30 ± 11 anni), e 50 controlli sani (35 ± 10 anni) per la presenza di anticorpi circolanti contro le isole pancreatiche (ICA), anticorpi contro l'antigene decarbossilasi dell'acido glutamico (GADA 65), di immunoglobuline sia di classe A sia di classe G contro la gliadina (IgA e IgG-AGA). In tutti i pazienti che mostravano positività agli AGA, sono stati dosati anche gli anticorpi IgA anti-endomisio con metodica di immunofluorescenza indiretta (EmA).

I campioni sono risultati positivi per gli ICA in 19 diabetici (26%), 4 genitori (6%), 4 fratelli (2%), 0 controlli ($p<0.001$); sono risultati positivi per i GADA in 34 diabetici (46%), 4 genitori (6%), 1 fratello (2%), 0 controlli ($p<0.001$). Sono risultati positivi agli IgA-AGA (>4.4 mg/L) 25 pazienti diabetici (34%), 10 genitori (14%), 5 fratelli (8%), 3 controlli (6%) ($p<0.001$). Per le IgG-AGA sono risultati positivi (>18 mg/L) 4 pazienti diabetici (5%), 5 genitori (7%), 0 fratelli (0%), 4 controlli (8%). In 1 diabetico e 2 genitori sono stati trovati sia IgA che IgG-AGA. La prevalenza di positività agli ICA, GADA, e IgA-AGA nei pazienti di tipo I era maggiore che nei controlli ($p<0.001$). Infine, nei 50 soggetti positivi agli AGA sono stati dosati gli EmA: solamente 2 di loro sono risultati positivi, un paziente diabetico ed un fratello. Il paziente diabetico, che aveva come unico sintomo di malassorbimento un'anemia sideropenica, è stato sottoposto a biopsia del digiuno che ha dato la conferma istologica di morbo celiaco. L'unico fratello positivo agli EmA presentava anche grave sideropenia, ma rifiutava la biopsia.

Noi concludiamo che:

- 1) non è possibile diagnosticare il morbo celiaco solo sulla base dei marcatori sierologici IgA e IgG-AGA. Comunque, la determinazione di tali anticorpi è utile, in associazione con gli EmA, nello screening generale, preliminarmente alla biopsia endoscopica;
- 2) la prevalenza di IgA-AGA maggiore nei pazienti IDDM rispetto agli altri gruppi, esclude false positività del test stesso, mentre suggerisce l'ipotesi di un'associazione patogenetica di entrambi i disordini immunologici, forse mediata dai linfociti intraepiteliali TCR.

INTERLEUCHIN-6 AND TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA LEVELS IN PATIENTS WITH METASTATIC BREAST CARCINOMA

Metelli M.R., Fulceri F., Puccetti C., Tararà M., Cerri P., Giordani R.

Clinical Biochemistry Laboratory, University of Pisa, Italy.

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional immune mediator produced also by normal human mammary epithelial cells and transformed cells of breast carcinoma. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) is a cytokine produced by macrophages, involved in apoptosis and necrosis of cancer cells. Increased blood levels of IL-6 and TNF alpha have been found in patients with different types of cancer. The role of these cytokines in patients with breast cancer has not been determined yet. The aim of the present study was to assess whether those factors differed between breast cancer patients and healthy controls and, within the breast cancer patients, between those with active disease and those in remission. We measured plasma concentrations of IL-6 and TNF alpha in 25 patients with breast cancer (mean age 62 + 10 SD years): 19 patients were under treatment for metastases with partial or complete response, 6 patients had been disease-free for at least 36 months. IL-6 and TNF alpha in the patients were determined repeatedly over a one-year period including treatment-free periods. Plasma samples from 22 healthy women (mean age 45 + 13 SD years) were used for control determinations. Blood samples were drawn in the morning, and plasma was stored immediately at -20° C. Plasma concentrations of IL-6 and TNF alpha were determined quantitatively by enzyme-linked immunosorbent assay (Biosource International, Inc.).

IL-6 plasma levels were significantly higher in the 19 patients with metastases than in control subjects (median 9.7 vs 2.3, $p = 0.00005$) and in the 6 disease-free patients (median 9.7 vs 3.4, $p = 0.02$). TNF alpha was significantly higher in metastatic patients than in controls (median 32 vs 10, $p = 0.00003$). TNF alpha was not determined in the 6 disease-free patients. In the 19 patients with metastatic breast cancer IL-6 and TNF alpha levels obtained pre and post chemotherapy did not differ significantly. These findings, although preliminary and in need of replication in larger samples, show that IL 6 and TNF alpha are abnormally elevated in metastatic breast cancer patients and suggest a potential usefulness of those factors in monitoring breast cancer.

DOSAGGIO DELLA 90K/MAC-2BP NEL LIQUIDO SEMINALE DI PAZIENTI INFERTILI

Iacovazzi P.A., Caroppo E.*, Barletta D., D'Amato G.*, Correale M.

Unità Operativa di Patologia Clinica ed Unità Operativa di Fisiopatologia della Riproduzione Umana, I.R.C.C.S. "S. De Bellis", Castellana Grotte (Ba).

La glicoproteina immunomodulante 90K appartiene alla S.R.C.R. e la sua struttura molecolare è identica a quella della proteina macrofagica Mac-2BP. Livelli sierici di 90K più elevati sono stati dosati in corso di varie patologie sia infettive che neoplastiche. Lo sviluppo delle tecniche di procreazione medicalmente assistita ha indotto lo studio dell'effetto immunomodulante degli steroidi sessuali ed in particolare, nei soggetti di sesso maschile, del testosterone. Infatti nei pazienti maschi con ipogonadismo ipogonadotropo risultano aumentati i livelli delle immunoglobuline circolanti, delle interleuchine (IL2 e IL4), del numero di linfociti circolanti, della percentuale di linfociti CD3+, CD4+ e CD19+ e del rapporto CD4/CD8. Tali livelli vengono normalizzati dalla terapia sostitutiva gonadotropinica.

In questo studio effettuato il dosaggio della 90K nel plasma seminale (P.S.) di pazienti infertili per valutarne la correlazione con i livelli plasmatici e seminali di testosterone.

Sono stati valutati retrospettivamente 40 pazienti infertili maschi, di età compresa tra 26 e 59 anni. I campioni di liquido seminale, ottenuti dopo 3-4 giorni di astinenza sessuale, sono stati valutati secondo i criteri della WHO. Il plasma seminale è stato ottenuto dopo centrifugazione. La 90K seminale è stata dosata usando una metodica ELISA (DIESSE, Italia) . In base all'esame standard del P.S. i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: 16 (40%) con parametri seminali normali, 8 (20%) con azoospermia e 16 (40%) con ologozoospermia severa. Il dosaggio della 90K nel P.S. nei 40 soggetti ha dato un valore medio di 36.82 ± 14.7 ng/ml (min. 11ng/ml, max. 83ng/ml); le differenze nei tre gruppi esaminati non differiscono significativamente ($p > 0.05$). Lo stesso risultato è stato ottenuto per i livelli seminali di testosterone, mentre le concentrazioni plasmatiche dell'ormone risultano significativamente maggiori nei pazienti normospermici rispetto a quelli degli altri due gruppi ($p > 0.001$). Non si è evidenziata una correlazione significativa tra i livelli seminali di 90K e le concentrazioni plasmatiche ($r = 0.04$) e seminali di testosterone ($r = 0.15$).

Alla luce di questi risultati e delle evidenze riguardanti il ruolo del testosterone nella modulazione della risposta immunitaria il ruolo della 90K nell'immunità intratesticolare non sembra essere rilevante.

DIFFERENCE IN OXIDATION STATE BETWEEN NATIVE-LDL PREPARED BY DIALYSIS OR GEL FILTRATION

Carru C., Pes G.M., Zinellu A., Galistu F., Barca M., Pasciu V., Lumbau F., [§]Tadolini B., Deiana L.

Chair of Clinical Biochemistry and [§]Department of Biomedical Sciences – University of Sassari – V.le S. Pietro 43/ b – 07100 Sassari – ITALY

Oxidation of Low Density Lipoprotein (LDL) is considered a contributing factor to the development of atherosclerotic lesions. However, to utilise the oxidative state of LDL as a reliable marker of cardiovascular risk, two methodological aspects must be defined: a) a purification procedure which minimizes the pre-analytical oxidation; b) a biochemical marker of LDL oxidative state with a low analytical variability. We compared two methods to remove salts and antioxidants during LDL purification: 24 h dialysis (D-LDL) and direct gel filtration (F-LDL). The native-LDL were then incubated with the metal catalyst CuSO_4 at different times and three independent markers of oxidative stress such as conjugated dienes (CD), lipid hydroperoxides (ROOH) (1) and the relative electrophoretic mobility (REM) (2) were assessed. We also evaluated by HPLC the amount of the antioxidant α -tocopherol (Vit.E) in both F-LDL and D-LDL. On the basis of all three markers, native F-LDL are less susceptible to oxidation than native D-LDL when added with CuSO_4 . The REM of F-LDL ($1,019 \pm 0,002$) and D-LDL ($1,075 \pm 0,003$) were significantly different ($P=0.002$) even before the addition of the metal catalyst. In contrast, CD and ROOH content became significantly different only after the addition of copper ($P<0.00001$ and $P<0.05$ respectively). Furthermore, the content of Vit. E in F-LDL (14.405 ± 1.915 nmol α -toc/mg LDL protein) was significantly higher than in D-LDL (9.648 ± 0.878 nmol α -toc/mg LDL protein) ($P<0.005$). We conclude that a rapid ultracentrifugation followed by gel filtration is a more convenient procedure than dialysis for the isolation of native-LDL. In particular, the recovery of Vit. E is higher for F-LDL than for D-LDL and is associated to a longer lag-phase during Cu-induced oxidation. Finally, we suggest the use of capillary electrophoresis as the method of choice to monitor any variation in oxidative state during the test *in vitro* for oxidation of LDL.

1) L. Deiana, C. Carru, G.M. Pes; B. Tadolini *Spectrophotometric measurement of hydroperoxides by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange*. Free Radicals Research (1999) 31, (3): 237-44

2) Stocks J., Miller N.E. *Capillary electrophoresis to monitor the oxidative modification of low density lipoproteins*. Journal of Lipid Research (1998) 39: 1305-1309.

ALTERATI LIVELLI DI mRNA DELLA Cu/Zn SOD IN CELLULE CaCo2 DOPO STRESS OSSIDATIVO

Casciani S.*^o, D'Archivio M.*^o, Masella R.*^o, De Vincenzi M.*^o, Federici G.*^o, Giovannini C.*^o, Dessi M.*^o

* II Univ. Roma "Tor Vergata" Dip. Medicina Interna
^o ISS Roma, Lab: Biochimica Gastroenterica

Si hanno evidenze sperimentali che la qualità della dieta ed il tipo di grassi assunto, attraverso la presenza di quantità variabili di idroperossidi, possa influire sullo stato di ossidazione delle LDL circolanti. La presenza di diversi tipi di acidi grassi in alimenti di origine animale (in particolare gli acidi grassi polinsaturi, risultano soggetti all'attacco di radicali liberi che scatenano fenomeni di ossidazione) possono dare luogo alla formazione di prodotti tossici quali idroperossidi, lipoperossidi e prodotti di lipoperossidazione terminali (aldeidi a catena corta) capaci di reagire con cellule e tessuti determinando danni di tipo ossidativo.

E' quindi importante approfondire gli studi riguardanti i meccanismi di protezione esercitati dagli enzimi antiossidanti presenti nella cellula. L'epitelio intestinale per il suo ruolo di barriera fra ambiente esterno e interno dell'organismo, risulta essere il tessuto che per primo viene a contatto con le sostanze di origine alimentare, rappresentando quindi la sede maggiormente soggetta ad una possibile azione tossica di queste. Le caratteristiche della linea cellulare enterocitica Caco-2¹, ne fanno un valido modello *in vitro* per lo studio di tutte quelle sostanze che vengono in contatto con l'intestino tenue ed esercitano su questo, il loro effetto.

Lo studio si propone di individuare le basi cellulari e molecolari dell'effetto mediato da lipoproteine ossidate a bassa densità (ox-LDL), usando come modello cellulare *in vitro*, la linea stabilizzata di enterociti Caco-2. A questo scopo si vuole determinare il ruolo degli enzimi coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio redox intracellulare; in particolare abbiamo studiato l'enzima superossidodismutasi (Cu/Zn SOD) di cui abbiamo determinato l'espressione dopo stimolazione e non con ox-LDL, mediante l'individuazione dei prodotti di trascrizione (mRNA), con tecniche di estrazione e RT-PCR, coamplificando il gene house-keeping β 2-microglobulina come controllo per la successiva analisi semiquantitativa (densitometria). Le cellule Caco-2 sono state sottoposte a stress ossidativo mediato dalle ox-LDL, per diversi tempi (da 6 a 48 ore) ed ad ogni tempo è stato determinato il livello di mRNA rispetto ad un controllo non sottoposto a stress. Alle stesse condizioni sperimentali, è stata anche determinata l'attività enzimatica. La correlazione tra l'attività della Cu/Zn SOD ed i livelli di mRNA suggerisce che può esserci variazione a livello di trascrizione.

¹ - Baker S.S and Baker R.D., 1992, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 643-647