

ACIDO VALPROICO: SEMPLICEMENTE UN ANTIEPILETTICO?

De Grazia U., Balzarotti M., Ciusani E., Gelati M., Salmaggi A., Croci D.

Istituto Nazionale Neurologico "Carlo Besta", Via Celoria 11, 20133 Milano

È stato recentemente dimostrato che l'Acido Valproico (VPA) (farmaco ad azione antiepilettica) è in grado di inibire in misura significativa l'attività delle istone-deacetilasi, inducendo da una parte un aumento della differenziazione cellulare e dall'altra un incremento dell'apoptosi in cellule tumorali.

Le istone-deacetilasi hanno un ruolo fondamentale nella regolazione della trascrizione genica e sono coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, nei processi di differenziazione e nelle neoplasie.

Gli inibitori delle istone-deacetilasi sono in grado di ridurre la crescita di varie cellule trasformate in coltura e di inibire la crescita di xenotrapianti di neuroblastoma umano

Nonostante i progressi del trattamento chirurgico, radiante e chemioterapico dei gliomi maligni, la prognosi di questi tumori rimane infausta, con una aspettativa di vita pari a 12 mesi circa nei glioblastomi.

Farmaci inibitori delle topoisomerasi (di tipo I e II) sono già stati utilizzati in modelli sperimentali di gliomi maligni con buoni risultati, è stata dimostrata inoltre una stretta associazione tra le topoisomerasi II e le istone-deacetilasi I e II mediante studi di coprecipitazione. Questa associazione permette di ipotizzare una possibile azione sinergica tra inibitori delle istone-deacetilasi e farmaci chemioterapici attivi sulle topoisomerasi.

In questo studio abbiamo valutato l'efficacia del VPA (da solo o in associazione con alcuni farmaci chemioterapici attivi sulle topoisomerasi) sulla crescita di linee cellulari di glioma e astrocitoma umano.

I dati preliminari hanno mostrato mediate valutazione al citofluorimetro (FACS Becton-Dickinson) con anticorpi specifici, un incremento di acetilazione degli istoni correlato ad un aumento della apoptosi. Gli studi di tossicità in vitro, hanno mostrato inoltre una significativa azione sinergica tra VPA e: Irinotecam, 5-fluorouracile, e Adriamicina in quanto le cellule cotratte subivano un aumento di tossicità superiore al 50%, contro il 30% delle cellule trattate con il solo VPA, rispetto al controllo non trattato.

1. Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. Shih-Chang Tsai et al.

Novembre 2000 vol. 26. Nature Genetics pag 349-353

CRITERI DI ACCETTABILITÀ DELLE CURVE DI CALIBRAZIONE NEL DOSAGGIO DELLE DROGHE D'ABUSO SU INTEGRA 700

Rettondini M.

U.O. Laboratorio analisi – Azienda ULSS 20 Verona

Il dosaggio di screening delle droghe d'abuso è effettuato nel nostro laboratorio su Integra 700 della Ditta Roche utilizzando un metodo analitico che si basa sull'interazione cinetica di microparticelle in soluzione e successiva misurazione tramite variazioni della luce trasmessa. In assenza di droga nel campione, l'anticorpo libero si lega alla droga coniugata alle microparticelle dando origine alla formazione di aggregati; viceversa, se la droga è presente, questa, legandosi all'anticorpo, non lo rende più disponibile per la formazione di aggregati.

L'assorbanza aumenta nel primo caso e diminuisce nel secondo: è cioè inversamente proporzionale alla concentrazione di droga nel campione.

Nella nostra realtà, i campioni di urine provengono in larga misura dal SerT di pertinenza (circa il 95%) ed il resto dai reparti o come urgenze soprattutto di fine settimana: la mole di lavoro si avvicina settimanalmente all'analisi di circa 120 – 150 campioni, per un totale di circa 5000 dosaggi/mese dei principali analiti: oppiacei, amfetamine, cocaina, cannabinoidi, benzodiazepine, barbiturici, metadone.

Il processo analitico, totalmente automatizzato, prevede l'accettazione delle curve di calibrazione (esecuzione in doppio di standard a concentrazione scalare e calcolate secondo l'interpolazione lineare o esponenziale, mediamente eseguite ogni 30 giorni), la gestione di un Controllo di Qualità Interno (CQI) (giornaliero, su due livelli, per la verifica del potere discriminante negativo/positivo), oltre che la partecipazione ad un Programma di VEQ (Proficiency testing), che consiste nel processare ed evidenziare la presenza o meno di classi di sostanze in campioni ignoti, precedentemente testati in GC/MS da laboratori di riferimento.

L'accettazione delle curve di calibrazione, a nostro parere, è un punto cruciale di tutto il processo, perché le verifiche da parte dello strumento e/o dell'utilizzatore sono riferite al rispetto della sola monotonicità della curva.

Abbiamo quindi deciso di introdurre alcuni criteri per l'accettazione delle curve di calibrazione che, in riferimento al lotto di reagenti e di calibratori in uso, prendono in considerazione:

- Il valore dell'assorbanza del primo e dell'ultimo punto della curva
- Il Delta assorbanza tra questi due punti (verifica della pendenza generale)
- Il Delta assorbanza tra il punto precedente il cut-off ed il punto vicino o uguale al cut-off (verifica del potere discriminante dei negativi)
- Il Delta assorbanza tra il punto successivo al cut-off ed il punto vicino o uguale al cut-off (verifica del potere discriminante dei positivi)

CONFRONTO TRA I SISTEMI ABBOTT TDX E DIMENSION RxL NEL DOSAGGIO DELLA CICLOSPORINA A

Ingaldi M., Crognale S., Vanni C., Romano C., Gelormini R., D'Aquino M.L.

Laboratorio di Patologia Clinica I ASL Chieti

Scopo del lavoro è stato quello di correlare 2 sistemi analitici: TDX ditta Abbott e Dimension RxL ditta Dade-Behring (1) per il dosaggio della Ciclosporina A.

Il primo utilizza un metodo immunologico a fluorescenza a luce polarizzata (FPIA) mentre il secondo un metodo immunologico basato su tecnologia EMIT.

Il nostro lavoro, iniziato il 21 Marzo 2002 e terminato il 30 Aprile 2002, è stato condotto su 101 casi provenienti da 46 pazienti ospedalizzati e ambulatoriali con età media di 47 anni (range 13-71) di cui 20 femmine (età media 43) e 26 maschi (età media 50.1)

L'analisi descrittiva e statistica ha evidenziato in entrambi i sistemi una distribuzione non gaussiana dei dati (test di Kolmogorov-Smirnov e test Skewness).

Nella tabella I vengono riportati gli interquartili e l'indice di Skewness e il suo S.E.

Abbiamo inoltre calcolato il coefficiente di correlazione con il test di Spearman (per dati non gaussiani) che ha evidenziato una ottima correlazione $R=0.9381$ e $P=0.000$.

Con test di Wilcoxon, per la verifica dell'ipotesi 0, abbiamo ottenuto una $Z=-8.4928$ e $P=0.000$, che esplicita la diversità statistica dei due sistemi.

La retta di regressione, considerando il sistema TDX in uso nel nostro laboratorio da diversi anni, come sistema di riferimento è espressa dalla seguente equazione $TDX=53.4+1.028$ Dimension RxL.

	N	25 th percentile	50 th percentile	75 th percentile	Skewness (Asimmetria)	S.E Skewness
RXL (ng/mL)	101	79.3	130.9	210.8	4.264	0.240
TDX (ng/mL)	101	124	185	286	3.789	0.240

Il nostro lavoro evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i due sistemi (test di Wilcoxon) per il dosaggio della Ciclosporina A, probabilmente dovuta alla diversa specificità dei due sistemi.

1) Panzali A., Albertini A. : Farmaci. Monitoraggio terapeutico. Edizioni Sorbona, Napoli, 2000; 56-64.

CICLOSPORINA A ACMIA SU DIMENSION RxL: EFFICACIA DEL PRETRATTAMENTO "ON BOARD" E INTERVALLO DINAMICO DI MISURA

Zoppi F., Masarin A., Marocchi A.

A.O. Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano

Abbiamo valutato l'efficacia del pretrattamento e il limite effettivo di linearità del metodo ACMIA per la misura della Ciclosporina A (CsA) eseguito su Dimension RxL (Dade-Behring). Il campione di sangue viene processato integralmente dalla macchina. Una quantità esatta di campione (200 μ L) viene depositato in cospette senza rilevazione di livello. Nella macchina il campione è sonicato per pochi secondi con una sonda acustica; 5 μ L di campione sonicato sono prelevati e processati nel cosiddetto "modulo eterogeneo". Abbiamo verificato la efficacia della sonicazione, ponendo campioni dello stesso sangue contenenti CsA in bagno ad ultrasuoni per tempi variabili da 1 a 30 min, e poi processandoli sull'RxL. Già nel campione sonicato per 1 min la concentrazione di CsA misurata è più alta del 15 % rispetto a quella misurata nel campione sonicato dal solo RxL. Incrementi della stessa intensità si manifestano anche nei campioni sonicati più a lungo. Dati del UKQAS riportano una differenza di -15μ g/L tra ACMIA e HPLC, a concentrazioni $< 200 \mu$ g/L.

Per valutare il reale intervallo dinamico (dichiarato: fino a 500 μ g/L), una mescolanza di campioni di sangue privi di CsA è stata addizionata di CsA fino ad ottenere una concentrazione di 3000 μ g/L. Tale soluzione è stata diluita con il pool privo di CsA fino al valore di 50 μ g/L. La regressione lineare tra tutti i valori misurati (y) e valori calcolati (x) ha dato i seguenti risultati: $y=0,636x+216 \mu$ g/L [regressione 1], $r=0,972$, $n=21$, $S_{y,x}=133 \mu$ g/L. Dividendo la curva in due tratti, si possono individuare: un tratto nettamente rettilineo da 50 a 900 μ g/L con i seguenti parametri di regressione: $y=1,01x-7 \mu$ g/L [regressione 2], $r=0,997$, $n=10$, $S_{y,x}=24 \mu$ g/L, ed un secondo, rozzamente rettilineo da 1000 a 3000 μ g/L, con i seguenti parametri di regressione: $y=0,454x+587 \mu$ g/L [regressione 3], $r=0,979$, $n=11$, $S_{y,x}=65 \mu$ g/L. Operativamente sarebbe corretto diluire tutti i campioni con valore superiore a 1000 μ g/L, ma noi abbiamo provato anche a correggere, sulla base della regressione 3, i valori di concentrazione misurati utilizzando l'equazione: valore calcolato = 2,113 valore misurato - 1168 μ g/L. Fino ad ora sono stati analizzati 50 campioni diluiti e il valore ottenuto è stato correlato con il valore, corretto, dello stesso campione indiluito.

I parametri ottenuti per la regressione lineare sono: *valore calcolato* = 1,00 *valore da diluito* - 4 μ g/L, $r=0,957$, $S_{y,x}=116 \mu$ g/L, intervallo di concentrazione dei campioni diluiti. 1080-2665 μ g/L.

Possiamo pertanto concludere che il reale limite superiore di linearità del metodo ACMIA su Dimension RxL è estensibile fino a 1000 μ g/L e che la correzione suggerita potrebbe evitare costose riprocessazioni dei campioni con concentrazione misurata, nel campione non diluito, superiore a 1100 μ g/L. Holt DW, Armstrong VW, Griesmacher A, Morris RG, Napoli KL, Shaw LM. Ther Drug Monit. 2002;24:59-67.

LINEE GUIDA DI "GESTIONE CAMPIONI TOSSICOLOGICI": ESPERIENZA DI RIMINI: METODOLOGIA APPLICATA E RISULTATI

Filocamo M.*, Arlotti C.*, Casali D.*, Peruzzi F.*, Ceroni V.*, Semprini C.***, Marzaloni M.**, Gambetti M.***, Corbelli G.****, Donati D.°, Gugnali M.°, Sale A.M.°, Casalboni D.*****, Mariani P.*****

Servizio di Medicina di Laboratorio Rimini*, Servizio di Medicina d'Urgenza Rimini**, Servizio di Pronto Soccorso Riccione***, Polizia di Stato****, SeRT Rimini e Riccione*****, Casa Circondariale°, Commissione Medica Locale Patente di Guida°°

In seguito a processo di revisione organizzativa finalizzato all'ottimizzazione delle risorse ed al miglioramento del servizio offerto, nel 1999 si completava la creazione di un unico Laboratorio Aziendale di Farmaco-Tossicologia Clinica che doveva servire tutta la provincia di Rimini.

Il primo passo relativo alla suddetta unificazione, risultava pertanto quello di conoscere il grado di soddisfazione dei nostri clienti al fine di evidenziare, analizzare e migliorare le eventuali criticità. Veniva quindi implementato un gruppo di studio multidisciplinare, formato da professionisti esperti, rappresentanti le U.O. coinvolte nella gestione del problema, quali SeRT, Medicina d'Urgenza, Pronto Soccorso, Polizia di Stato, Casa Circondariale, Commissione Medica Locale Patente di Guida, Servizio di Medicina di Laboratorio. L'obiettivo che ci si poneva era quello di pervenire alla definizione di uno standard che rappresentasse il miglior compromesso possibile tra le necessità evidenziate dalle Società Scientifiche e le diverse situazioni locali. Il nostro lavoro cominciava con l'identificazione di Linee Guida nazionali ed internazionali autorevoli da sottoporre ad un processo d'adattamento locale, sulla base delle disponibilità professionali, tecnologiche, e logistico-strutturali. Sono state attentamente confrontate due Linee Guida di riferimento: "Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs" della Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAMHSA), e: *Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici*, redatta da Istituto Superiore di Sanità Roma. (Rapporti ISTISAN, 96/29). La commissione ha cercato di posizionarne gli elementi fondamentali il più compatibilmente possibile alla realtà locale, con l'elaborazione e la successiva messa in funzione di un documento che suddivide il processo in tre fasi standardizzate:

1. Fase preanalitica (identificazione del soggetto, raccolta e trasporto del campione, catena di custodia)
2. Fase analitica (che prevede test di screening e test di conferma)
3. Fase postanalitica (stoccaggio dei campioni, refertazione e consegna del referto)

Si è stabilita una revisione annuale finalizzata al continuo aggiornamento ad integrazione del documento stesso.

Le suddette Linee Guida sono state diffuse tramite materiale informativo ed è stata successivamente valutata la loro efficacia e la loro applicabilità nella pratica, misurando l'impatto, attraverso indicatori di processo, quali il numero delle richieste pervenute secondo protocollo e le richieste Non Conformi.

Le singole Non Conformità sono state registrate su relativo "foglio di raccolta dati".

La successiva elaborazione dei dati raccolti ha permesso di individuare la frequenza, la tipologia e la provenienza delle Non Conformità. Si è individuata la difficoltà di applicazione ottimale del processo nella scarsa tendenza da parte di tutti gli attori ad accettare cambiamenti e, nell'inefficacia della diffusione passiva dell'informazione.

Sono state pertanto ricercate ed implementate strategie in grado di garantire la veloce diffusione del documento tra gli operatori sanitari, quali utilizzo di flow chart, seminario di aggiornamento e tavola rotonda al fine di evidenziare i benefici che derivano dalla condivisione e dalla applicazione delle linee guida.

I dati relativi a queste ultime azioni correttive sono risultati confortanti, ma si ritiene di fondamentale importanza seguirne temporalmente l'adozione nella pratica quotidiana, con impegno costante e tenace per assicurarne la continua divulgazione informativa tra il personale stabile e del turn over.

Nel complesso, si ritiene questa nostra esperienza positiva, sia per quanto riguarda il clima di collaborazione instauratosi con il personale tutto dei reparti di Diagnosi e Cura, sia per il miglioramento della qualità sulle prestazioni, misurato con la nuova appropriatezza della richiesta, la diminuzione delle Non conformità, il gradimento dell'utilizzatore.

In conclusione l'autorevolezza, l'audit costante e lo sforzo di tutto il personale coinvolto, sono risultate condizioni necessarie ed imprescindibili ad assicurare il successo di uno strumento che si propone come obiettivo prioritario, il miglioramento continuo della Qualità delle prestazioni erogate

BIBLIOGRAFIA

- DHHS/SAMSHA. 1998. Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs (1994). Fed. Reg. 63 (219):63483-63484
- Zuccaro P., Pichini S., Altieri I., Pellegrini M. & Pacifici R. 1996. Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici. Istituto Superiore di Sanità Roma. (Rapporti ISTISAN, 96/29)

IL TDM NELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE - ANALISI COSTI/BENEFICIO-

Ciuti R., Fabeni C., Corsi P.[§]

Laboratorio centrale analisi biochimiche cliniche
§ U.O. Malattie Infettive – Careggi- Firenze

Sono passati 15 anni da quando fu introdotta la prima terapia efficace antivirale con Zidovudina (AZT), oggi la battaglia contro l'infezione da HIV si combatte con la terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) che impiega l'uso combinato di più farmaci appartenenti a 3 gruppi di azione: Inibitori Nucleosidici (NRTI) e Inibitori Non-Nucleosidici della Trascrittasi Inversa (NNRTI), Inibitori delle Proteasi (IP). La terapia consiste nella somministrazione di un cocktail di 3 o 4 diversi farmaci, sui 15 attualmente approvati, in più dosi giornaliere. Il paziente deve assumere più di 10 pillole al giorno con la conseguente spesso scarsa compliance alla terapia con rischio di tolleranza al farmaco, inoltre essendo questi farmaci metabolizzati dal cit.P450, presentano considerevoli interazioni tra farmaci con possibile tossicità e presenza di fastidiosi effetti collaterali. Per questi motivi viene raccomandato il TDM di questi farmaci sia al tempo zero (trough level) che al picco, pur rendendosi conto delle difficoltà organizzative nell'effettuare più prelievi/die al paziente (i tempi di picco sono diversi da gruppo a gruppo di farmaci). Per soddisfare le esigenze dei centri di malattie infettive, abbiamo messo a punto 3 diverse metodiche in HPLC-UV (colonna C-18 reverse) in modo da analizzare tutti e 15 farmaci con la necessaria risoluzione dei picchi ed attendibilità di risultati. (I) per Nevirapina (NNRTI), Zidovudina (NRTI) Abacavir (NRTI) estraz. con CHCl₃/ isopropanolo 80:20, $\lambda = 266$ nm, f.m.=acetoneitrile (ACN) 17% in tamp fosfato pH 7.5, St.int=3-isobutil-metil-xantina. (II) per Stavudina (NRTI), Didanosina (NRTI), Lamivudina (NRTI), Zalcitabina (NRTI); separaz. in C18 con MeOH, fm:4% ACN in tamp fosf pH 6.9, $\lambda = 248$ nm St.int.tegafur. (III) per gli IP Amprenavir, Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir, Lopinavir e Efavirenz (NNRTI), Tenofovir (NRTI), estraz. con EtAc/esano 1:1, $\lambda = 254$ nm, f.m. = ACN/ MeOH in tamp.fosf. pH 7.5 St int:antrone.

Dalla nostra esperienza di più di 1 anno di analisi sui farmaci anti-HIV abbiamo verificato la buona rispondenza dei valori basali e di picco degli IP ai dati clinici (viremia, effetti collaterali, interazioni), di più difficile interpretazione la risposta degli NRTI essendo questi preparati dei profarmaci che vengono attivati dopo fosforilazione

Concludendo si può affermare che il TDM dei farmaci antiretrovirali, pur non avendo ancora una definita standardizzazione, offre tuttavia delle informazioni preziose al clinico-infettivologo perché possa valutare l'aderenza del paziente al regime posologico prescritto, ottimizzare i regimi di dosaggio o in caso di interazioni eventualmente variare il protocollo farmacologico, in modo da regolare al meglio la terapia salvavita per questi pazienti.

VALUTAZIONE DI IMPIEGO DI UN OSMOMETRO NELLARICERCA DI ADULTERAZIONI DEI CAMPIONI URINARI TOSSICOLOGICI

Ciuti R., Giganti E., Berti S. *

Laboratorio Centrale di Analisi Biochimico-Cliniche,
Azienda Ospedaliera Careggi- Firenze; *A.Menarini
Diagnostics – Firenze

La potenziale adulterazione dei campioni urinari nella ricerca di sostanze stupefacenti è un problema serio e reale soprattutto se tale indagine riveste aspetto medico-legale. La tecnica più semplice di manipolazione del campione è la diluizione ottenuta o per assunzione di molti liquidi o per aggiunta di acqua direttamente in provetta, ma esistono anche una miriade di sostanze che, aggiunte al campione urinario, possono interferire sull'analisi di droghe specie nei casi in cui la determinazione è effettuata con metodi immunometrici. Il metodo più universalmente usato nei laboratori tossicologici è l'analisi della creatinuria per il suo basso costo e la sua automatizzabilità, ma non è in grado di rilevare sostanze adulteranti. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare metodi alternativi, altrettanto semplici e di rapida esecuzione della creatinuria, ma più indicativi per saggiare la veridicità del campione urinario. Abbiamo testato l'osmolalità con un sistema automatico come l'Osmostation OM 6050 (Menarini), il peso specifico con due sistemi: uno rifrattometrico con lo strumento Aution Max (Menarini) e uno spettrofotometrico con il kit Gravity-test (Microgenics) test omogeneo che sfrutta la reazione di ioni FeIII a formare un complesso col cloro che assorbe a 340 nm, il metodo è stata adattato all'analizzatore MEGA 2000.

Abbiamo analizzato 80 campioni urinari freschi con i quattro sistemi ottenendo le seguenti correlazioni:

Osmolalità vs rifrattometria: $r = 0.812$

Osmolalità vs gravity-test: $r = 0.896$

Osmolalità vs creatinuria: $r = 0.565$

Analizzando singolarmente ogni campione, comparando i risultati ottenuti con i 4 metodi, abbiamo constatato la non concordanza di 10/80 di valori di creatinuria, di 2/80 di valori spettrofotometrici e di 1/80 col metodo rifrattometrico (abnormemente alto) su un campione ricco di emazie. A differenza della creatinuria che non appare un parametro molto fedele della concentrazione urinaria, gli altri sistemi mostrano una discreta concordanza tra di loro. Questo suggerisce che, in campo tossicologico, esistono metodi alternativi, più validi della creatinuria per saggiare l'integrità di un campione urinario e che oggi sono anche competitivi per la loro possibilità di automazione e con una velocità di esecuzione tale da esaudire una media routine. L'osmolalità, per le sue peculiarità di indagine, offre maggiori garanzie di non interferenza da specie chimiche o dall'aspetto fisico del campione, il suo finora fattore limitante: la manualità e lentezza di esecuzione è stato superato dall'Osmostation, sistema che permette l'esecuzione di 30 campioni/ora sfruttando il principio dell'*ultra super cooling*® (brev.Arkray Inc.)

DETERMINAZIONE DI DROGHE D'ABUSO: VALUTAZIONE DEL METODO KIMS SU ANALIZZATORE DI CHIMICA CLINICA HITACHI MODULAR P (ROCHE DIAGNOSTICS)

Dall'Olio G¹, Burti E.², Giannuzzi M.³, Bonato G.², Spellanzon M.

¹Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza; ²Dipartimento di Patologia Clinica e Microbiologia, Ospedale di Bussolengo (VR), ASL 22; ³Roche Diagnostics, Milano

INTRODUZIONE: Il modo più pratico e quindi più largamente diffuso per stabilire se un individuo ha assunto sostanze illecite è l'analisi delle urine. Il Gruppo di Lavoro di esperti di Tossicologia dell'Unione Europea, con particolare riferimento ai controlli sul posto di lavoro, raccomanda per lo screening di sostanze stupefacenti l'uso di metodi immunometrici validati e di provata affidabilità. Scopo di questo lavoro è stato la valutazione delle caratteristiche chimico analitiche del metodo basato sull'interazione cinetica di microparticelle in soluzione (KIMS) applicato su analizzatore di chimica clinica Hitachi Modular P (Roche Diagnostics) per la determinazione di oppiacei, cocaina, cannabinoidi (THC) e metadone in campioni di urina.

MATERIALIE METODI: Confronto: sono stati analizzati con il sistema in esame Hitachi Modular P 40 campioni per ogni molecola, 15 negativi e 25 positivi. I campioni provenivano dal SERT ed erano stati preventivamente testati con il sistema Dimension RxL (Dade-Behring).

Precisione: nella serie (n=10) e fra le serie (n=31); è stato usato un controllo (Bio-Rad) con valore nominale 1.25 volte il cut-off.

Stabilità della calibrazione: la durata della calibrazione è stata valutata su un periodo di lavoro di un anno.

Calibrazioni del sistema Hitachi Modular P:

Oppiacei: morfina (ng/mL): 0, 150, 300, 600, 1000, 2000; cut-off = 300 ng/mL; Cocaina: bezoilecgonina (ng/mL): 0, 150, 300, 600; cut-off = 300 ng/mL; Cannabinoidi: delta 9 THC (ng/mL): 0, 25, 50, 100; cut-off = 50 ng/mL; Metadone: metadone (ng/mL): 0, 150, 300, 600; cut-off = 300 ng/mL.

Sistema HPLC Merck per l'analisi di eventuali risultati discrepanti. Sistema di chimica clinica Dimension RxL (Dade-Behring) con reattivi Emit II. Le calibrazioni dei due sistemi sono ottenute con le stesse molecole e con lo stesso numero di punti; sono adottati gli stessi valori di cut-off.

RISULTATI

- Precisione

Hitachi Modular P	oppiacei	cocaina	THC	metadone
nella serie CV%	3.3	2.1	6.9	2.6
fra le serie CV%	4.5	4.2	6.1	5.6

- Stabilità della calibrazione (Hitachi Modular P):

Oppiacei: 3 mesi; Cocaina: 2 mesi; THC: 1 mese; Metadone: 1 mese

- Confronto: Tutti i 40 campioni analizzati per ogni molecola hanno evidenziato piena concordanza fra il sistema in esame Hitachi Modular ed il Dimension RxL, sistema di riferimento. Anche per alcune urine con valori prossimi al cut-off (oppiacei e THC), analizzati anche con sistema HPLC, la concordanza è stata totale.

CONCLUSIONI: Le prove effettuate per la valutazione del metodo KIMS applicato su analizzatore automatico Hitachi Modular P per rilevare la presenza di oppiacei, cocaina, cannabinoidi e metadone in campioni di urina hanno dimostrato una buona precisione e sovrapposizione dei risultati con un sistema già utilizzato in routine. Queste caratteristiche, aggiunte alla lunga stabilità delle calibrazioni, portano a considerare il sistema in valutazione attendibile ed utilizzabile nello screening delle sostanze d'abuso.

DOSAGGIO DEL TACROLIMUS CON METODO EMIT IN GIOVANI PAZIENTI CON TRAPIANTO RENALE.

Tirelli A.S., Arnaboldi E., Arenzi A., Ghio L., Garavaglia R., Torresani E.

Istituti Clinici di Perfezionamento, Laboratorio di Biochimica Clinica, Via S. Barnaba 8, 20122 Milano

Tacrolimus (FK506), farmaco immunosoppressore relativamente recente, possiede un meccanismo d'azione simile alla ciclosporina (CSA), con effetti collaterali minori ed il suo impiego tende ad essere sempre più ampio da quello iniziale nei trapianti di fegato. Il ridotto intervallo terapeutico suggerisce però uno stretto monitoraggio dei livelli ematici.

Scopo del nostro lavoro è valutare l'intervallo terapeutico di FK506 in giovani pazienti con trapianto renale (Tx), dosando i livelli con recente metodo immunoenzimatico (EMIT) in confronto al metodo MEIA II più largamente diffuso. Abbiamo considerato 22 pazienti di età compresa tra i 5 e i 28 anni che hanno assunto FK506 per via orale alla dose di 0.30 mg/kg/die dall'inizio di trapianto per un periodo non inferiore ai sei mesi. La media dei livelli di FK506 considerando 53 determinazioni è risultata essere 9.04 +/- 3.6 ng/ml, senza variazioni significative degli indici di funzionalità renale ed epatica confermando il range terapeutico suggerito negli adulti di 5-10 ng/ml.

Con il metodo EMIT abbiamo ottenuto una correlazione di 0.90 rispetto al metodo MEIA con un coefficiente di variabilità interdosaggio del 10% e intradosaggio del 4.8%. Inoltre la strumentazione per il metodo EMIT permette una analisi veloce dei campioni senza limiti di numero.

Wallemacq PE, Reding R. FK 506 (Tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical and analytical aspects. Clin Chem 1993; 39:2219-2228

VALUTAZIONE DI UN TEST IMMUNOCHEMICO DI SCREENING PER RILEVARE LE "ECSTASY" (MDA, MDMA, MDEA) NELLE URINE

Masarin A., Zoppi F., Marocchi A.

A.O. Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano

Tra le droghe da discoteca sono largamente rappresentate le Sostanze di Tipo Amfetaminico (ATS), comunemente indicate come *designer drug*, che comprendono la "vera" ecstasy, MDMA, e le sostanze ad essa affini che hanno, tutte, la struttura dell'Alfa Metil FenilEtil AMINA, da cui AMFETAMINA.

Dal punto di vista analitico, sfortunatamente, i metodi immunochimici commerciali, formulati per rilevare l'amfetamina e la metamfetamina, hanno, verso le *designer drug*, reattività crociata variabile da un produttore all'altro e, spesso, molto bassa. Questo significa che il cut-off di 1000 µg/L, convenzionalmente accettato per le ATS, può non essere superato, e il "caso" perduto se tutti i campioni non sono analizzati con una tecnica cromatografica.

Di recente è stato introdotto, distribuito dalla ditta IL, un kit EMIT-like della ditta DRI (*Ecstasy Enzyme Immunoassay*) che, usando anticorpi molto specifici, riconosce i composti della famiglia delle "Ecstasy". Abbiamo misurato sullo strumento Mega (Dade-Behring) diversi campioni d'urine di soggetti per i quali la conferma dell'assunzione di tali sostanze era stata ottenuta analizzandoli in HPLC su REMEDI (Bio-Rad). Inoltre sono stati analizzati campioni d'urine appartenenti a diversi lotti del Proficiency Testing "Droghe e Sostanze Psicoattive" del CBFT dell'Università di Padova. Abbiamo così verificato la corrispondenza dei valori ottenuti con il metodo immunochimico con quelli di consenso forniti. Nelle condizioni analitiche selezionate (rapporto di volume campione: reagente 1: 25, lettura in cinetica in bicromatismo 340/412 nm, intervallo di lettura 86-98), l'intervallo dinamico è fino a 1000 µg/L. Stabilità della calibrazione: >15 giorni. La correlazione con il REMEDI: Ecstasy (DRI) = 1,086 REMEDI - 36 µg/L, $r = 0,993$, $Sy.x = 40 \mu\text{g/L}$, $n = 30$. L'imprecisione (20 replicati): *nella serie*: media 345 µg/L, $DS = 4,6 \mu\text{g/L}$, $CV\% 1,3$; media 629 µg/L, $DS = 7,2 \mu\text{g/L}$, $CV\% 1,1$; media 1022 µg/L, $DS = 10,2 \mu\text{g/L}$, $CV\% 1,0$; *tra le serie*: media 338 µg/L, $DS = 6,7 \mu\text{g/L}$, $CV\% 2,0$; media 619 µg/L, $DS = 10,8 \mu\text{g/L}$, $CV\% 1,75$. La verifica della reattività crociata media, a concentrazione di sostanza aggiunta di 600 µg/L, ha rilevato valori del 58 % per l'MDA e del 100 % per l'MDEA. La presenza contemporanea di MDA e di MDMA modifica le cinetiche di reazione: in miscele a concentrazione nota delle due sostanze, i risultati ottenuti col kit DRI non coincidono con quelli calcolati sulla base della reattività crociata. Nella nostra esperienza il kit soddisfa pienamente le esigenze di screening e permette di valutare la possibile assunzione di *designer drug*, con buona sensibilità analitica. Esse possano poi essere identificate con una tecnica fisica specifica.

TACROLIMUS NEL TRAPIANTO DI RENE: OTTIMIZZAZIONE DEL MONITORAGGIO CON IMPIEGO DI UN'AUC RIDOTTA

Caberlotto L., Vianello A.*, Maresca M.C.*, De Polo V.

Servizio di Chimica Clinica, * Divisione di Nefrologia e Centro Trapianti, Azienda ULSS n. 9, Piazza Ospedale, 31100 Treviso

Il Tacrolimus è un farmaco per la prevenzione primaria del rigetto d'organo in pazienti sottoposti a trapianto e per tale impiego è necessario il monitoraggio terapeutico. Infatti ha un indice terapeutico ristretto e una elevata variabilità interindividuale dei parametri cinetici. Nella pratica clinica, per molti farmaci, la determinazione della concentrazione pre-dose o "valle" sostituisce lo studio completo dell'area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC), parametro che esprime l'esposizione sistemica al farmaco, essendoci tra loro buona correlazione. Questa, nel trapianto di rene, è dimostrata solo nel periodo immediatamente successivo all'intervento. Pazienti sottoposti a trapianto di rene, con buona funzionalità dell'organo, sono stati studiati per individuare la migliore misura della concentrazione di Tacrolimus singola o in associazione, rispetto alla capacità di stima dell'AUC, e per valutare l'effettiva utilità clinica del dosaggio "valle".

Lo studio ha interessato 10 pazienti portatori di trapianto di rene da donatore cadavere, di età media di 47 ± 7.7 anni, età trapiantologica di 600 ± 1223 giorni, funzionalità renale stabilizzata (clearance della creatinina di 33.1 ± 16.7 mL/min) e dosaggio di Tacrolimus compreso tra 0.03 e 0.21 mg/Kg/die. Per ogni paziente sono stati complessivamente raccolti 13 campioni: il primo, prima della assunzione della dose del farmaco, come misura di "valle" (C0) e gli altri in successione, ad intervalli regolari di un'ora fino alla 12^a ora, prima della successiva dose (C1...C12). La determinazione di Tacrolimus sui campioni di sangue è stata effettuata con metodologia MEIA impiegando l'analizzatore Imx (Abbott Diagnostics). Con i risultati ottenuti nei diversi campioni di ogni paziente sono state costruite le curve concentrazione/tempo e calcolata l'AUC, con il metodo dei trapezoidi.

I risultati ottenuti evidenziano che alla prima ora vi è la concentrazione di picco con media di 31.4 ± 19.9 ng/mL. La correlazione tra le 13 misurazioni e l'AUC è sempre significativa, con coefficienti compresi tra 0.91 e 0.98 (il migliore è C5). La associazione di tempi che ha la migliore correlazione con l'AUC, valutata con la regressione multipla "stepwise", è fornita dalle misure eseguite ai tempi C5, C1, C8, C2, C6 ($r: 0.999$). La migliore associazione che impiega solo 2 prelievi è data dalle misure C5 e C1 ($r: 0.997$). La misura singola di "valle" ha una buona correlazione con AUC e può essere considerata un valido indice predittivo dell'esposizione totale dell'organismo al Tacrolimus.

Wong KM, Shek CC, Chau KF, Li CS. Abbreviated Tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 660-6.

SVILUPPO ED APPLICAZIONE DI UN PROGRAMMA PER LA GESTIONE INFORMATIZZATA DELLE NON CONFORMITÀ

Marozzi R., Gamba A., Carusillo G., Lanzini F., Magatelli P., Rezzola L.

A.O. di Chiari - Laboratorio Analisi P.O. di Iseo (BS)

Per ogni laboratorio certificato secondo la norma ISO 9001:2000 esiste la necessità di rilevare, gestire ed analizzare le non conformità (NC).

Poiché per l'attività di un Servizio quale il Laboratorio, la maggior parte delle non conformità non è riferita al processo, ma al prodotto, durante le varie fasi del processo (in ingresso, in processo ed in uscita) può presentarsi la necessità di eseguire numerose registrazioni.

Le NC risultano frequenti nella gestione dei campioni (es.: emolisi, campioni errati o non pervenuti), nella gestione delle richieste (es.: errori di codifica ed accettazione amministrativa), nell'attività di front-line con l'Utente (es.: ritardi di consegna, errori referto).

Nel corso dell'implementazione del Sistema Qualità è stata quindi sviluppata una metodologia di registrazione che consente di utilizzare appositi registri e codici per riassumere tipologia, trattamento e soluzione della non conformità.

La registrazione delle NC deve essere uno strumento efficace a disposizione della Direzione per la ricerca di eventi sentinella o di studio per piani di miglioramento. Per ottenere questo scopo è necessario che l'elaborazione sia svolta in un tempo sufficientemente breve per poter agire efficacemente.

A questi scopi sono stati valutati alcuni programmi per applicare una registrazione informatizzata dei dati di NC. Valutati il vantaggio di disporre di un applicativo personalizzato, che meglio si adatta alla situazione documentale e strutturale del Laboratorio ed il risparmio economico conseguibile, si è avviato un progetto di sviluppo interno di un sistema di registrazione informatica delle NC.

Attraverso l'impiego di Access™, software commerciale di larga diffusione, si è predisposto un programma che consente agli Operatori di inserire i dati dalle proprie postazioni di lavoro. Il file e l'archivio dei dati è installato sul server centrale del Laboratorio, sfruttando la modalità multi-task e la rete informatica del Laboratorio viene impiegato sui vari terminali di lavoro, senza interferire con quest'ultimo. L'efficienza del sistema è garantita dall'aggiornamento e dall'implementazione di nuove maschere di visualizzazione ed elaborazione. A questo si affianca un'apposita istruzione per l'addestramento del personale al loro impiego. L'efficacia deriva dalla centralizzazione e informatizzazione dell'archivio dati che consente una loro elaborazione in tempo reale.

La Direzione del laboratorio ha quindi la possibilità di creare e gestire vari indici e sottoindici di qualità per monitorare l'andamento del proprio Sistema Qualità.

- ISO 9001:2000

SISTEMA INTEGRATO DI GESTIONE DELLA QUALITÀ: LA NOSTRA ESPERIENZA APPLICATIVA CPA E UNI ISO 9001: 2000

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

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

La Patologia Clinica I dell'Azienda Policlinico di Bari ha deciso nel 1999 di istituire, all'interno della sua organizzazione, un sistema di gestione per la qualità secondo gli standard del CPA (Clinical Pathology Accreditation UK Ltd.) e, nell'ottica di un miglioramento continuo, ha valutato successivamente la possibilità di avviare un processo di certificazione secondo le norme ISO.

Scopo del lavoro è stato di:

- attivare un programma di certificazione che risultasse integrabile con le attività già introdotte con l'Accreditamento CPA
- migliorare il sistema di misurazione delle performance dei processi analitici e di servizio (interni ed esterni)
- utilizzare uno strumento operativo in grado di migliorare la struttura documentale in uso

Metodologia: E' stata valutata la norma UNI ISO 9001: 2000 al fine di identificare i caratteri comuni con gli standard CPA

Risultati:

Titolo del Paragrafo	CPA	UNI EN ISO 9001:2000
Responsabilità della Direzione		5
Politica della Qualità		5.3
Organizzazione		5.5.2 - 6.2.1
Responsabilità ed autorità	A2,B3,B4,B5	5.5.2
Risorse	A3,B1	6.1
Rappresentante della Direzione		5.5.3
Riesame da parte della Direzione	B6	5.6
Sistema Qualità	A1	4
Generalità		4.1
Procedure del sistema qualità		4.2
Pianificazione della qualità		5.4.2 - 7.1
Riesame del Contratto	D3	7.2.2
Controllo della progettazione		7.3
Controllo dei documenti e dei dati		5.5.6
Approvvigionamento	A7,A.7.1.	7.4
Controllo del prodotto fornito dal Cliente	D2	7.5.3
Identificazione e rintracciabilità del prodotto		7.5.2
Controllo del processo	D8,D9,C2, C7,D11,D12	7.1 - 7.5.1 - 7.5.5
Prove controlli e collaudi	F1	8.2.4
Controllo delle apparecchiature per prova, misurazione e collaudo		7.6
Stato delle prove, controlli e collaudi		7.5.1
Controllo del prodotto non conforme		8.3
Azioni correttive e preventive		8.4 - 8.5.2 - 8.5.3
Movimentazione, immagazzinamento, imballaggio, conservazione e consegna	C5,C9,D5,D7	7.5.4

Conclusioni:

A distanza di un anno dalla Certificazione è possibile affermare che la Norma UNI ISO 9001: 2000 ha permesso di implementare il sistema di gestione della qualità mediante l'acquisizione di procedure in grado di soddisfare le esigenze, le richieste ed i requisiti di qualità riuscendo comunque ad integrarsi nella realtà organizzativa, gestionale e procedurale già definita con il processo di Accreditamento CPA.

INTEGRAZIONE DEL LABORATORIO NEL SISTEMA QUALITÀ DI CASA DI CURA RIABILITATIVA INTENSIVA HIGH-TECH

*Trogia G., *Bosio K., *Gregori M., **Tallone B., **Rossato GL.

**Tecnos, V. Plava, 62, Torino; *STELLA del MATTINO, Cdc riabilitativa, Fondazione "Orizzonte Speranza", V. Mellana, 7, 12012 Boves, CN.

Obiettivi - Si descrive procedura che definisce: processo di laboratorio (L), criteri accettazione e tipologie di analisi. **Responsabile (R)** (medico, biologo): programmazione, gestione, esecuzione esami, CQ. **Tecnico(T)**: resp. operativa analisi, funzionamento-manutenzione apparecchi, gestione reagenti. **Metodologia processo**: accettazione campioni (Cp), analisi, trascrizione dati, controllo; salvo le emergenze (obbligo avvisare R). I Cp vengono prelevati e movimentati all'interno della Casa secondo le modalità dettagliate in I0904-3 con contenitori a tenuta; precauzioni personale addetto ai prelievi riportate in I0904-5. Criteri accettazione: 1) Provette congrue con l'esame richiesto (ved. I0904-1, P0801 e M0904-1), 2) Volume materia organica congruo; 3) Utilizzo etichetta (nome cognome paziente o codice a barre); 4) Provette non contaminate all'esterno. Se non rispondenti, si procede come da P1301 (=Gestione Non Conformità). Il L è ad uso interno della Casa di cura, effettua analisi in tutti i settori di Lab. (specifiche in procedura); per analiti non usuali si avvale del Lab. dell'Ospedale zonale di rilievo naz. La movimentazione campioni a struttura autorizzata regionale risponde alla L.R. 50 del 24/3/96 e avviene nelle condizioni previste dal regol. reg. 9/1/97 n°1. Per trasferimento Cp prelevati in altre strutture dalla Fondazione si segue Istr. I0904-6. I Cp sono accompagnati dal modulo M0904-1 firmato dal Resp. medico di reparto. (necessari: nome, cognome, sesso, data di nascita, data prelievo, firma di chi prescrive, chi prepara provette, chi esegue); copia archiviata in L. **Prassi operative**: 2 persone/turno; R per batteriologia, controllo fasi di lavoro, referti; T operatività analisi; calibrazioni; CQI ed E; trascrizione risultati, stampa fogli di lavoro, ecc. Ogni appartenente al gruppo si dedica ad un tipo di analisi, sec. istruzioni di lavoro a ruoli interscambiabili. I risultati sono trasferiti su scheda-paziente informatica con quelli auto-trasmessi al software, in rete accessibile dalle periferiche di tutta la Casa. Chi esegue l'analisi effettua prima verifica dati in autocontrollo (vedi I0904-1), definibile "forte" (non ulteriori controlli). In refertazione R può rifiutare risultati e disporre riesecuzione esame o prelievo. In caso di dato privo di senso clinico ci si attiene all'istruzione I0904-10. I **Risultati** vanno in cartella clinica informatica. R redige "Giudizio diagnostico" su scheda-paziente per analisi eseguite, valida Referti stampabili per Cartella cl. cartacea. **Conclusioni**: migliorata efficienza/efficacia, controllo processo, soddisfazione cliente. **Bibliogr**: Norme EN UNI ISO 9001 e s.m.; Mortilla M.G., La certificaz. del Sistema Q. di un Servizio san., UTET, MI 2000; Corso SIBioC Prepararsi all'Accredit. Istit., Torino gen., febr. 2001; Barbetto E. et al., Manuale per l'inserimento..., Bioch. Clin. 25 (6), 471-485, 2001.

LA GESTIONE GLOBALE DEL LABORATORIO: MITO, SOGNO, O REALTÀ? OVVERO: L'INFORMATICA PUÒ RISOLVERE TUTTI I PROBLEMI DEL LABORATORIO ANALISI?

Carrara N., Di Vico M., Garro C., Mondino M.R., Bracco G.

Laboratorio Analisi; ASO S. Croce e Carle Cuneo.

Premesse: Identificazione e rintracciabilità di campioni, richieste e impegnative hanno da sempre costituito un problema nell'organizzazione, sia in quella tradizionale, sia in quella moderna e informatizzata.

Scopi/obiettivi: Superare le incongruenze collegate al diverso trattamento dei campioni:

- tipo di materiale biologico,
- modalità di processazione,
- orari di accettazione: routine, urgenze ambulatoriali, ricoverati, pronto soccorso, sale operatorie, espienti di organo,
- tempi di refertazione: esami con tempi di risposta di minuti, ore o giorni.

Collaudare un sistema di identificazione e di rintracciabilità di: campioni, schede di richiesta esami, impegnative mediche, che permetta di ottimizzare le fasi di processo, riducendo al minimo l'intervento umano.

Materiali e metodi: Sistema gestionale (LIS) di Metafora, Milano. Schede ottiche di identificazione degli esami con codice a barre (Reggiani, Milano). Lettore automatico di schede ottiche (OpScan - AXIOME). Collegamento on-line degli analizzatori (25 strumenti per un totale di 85% di analisi trasmesse al LIS. Doppio sistema di smistamento dei campioni, automatico e manuale, con check-in dei campioni. Ulteriore sistema di smistamento dei campioni all'interno dei settori, ove necessario. Archiviazione immediata di schede ottiche, impegnative, campioni processati.

I software necessari a completare il sistema gestionale, nei processi interni legati alla rintracciabilità e alla aliquotazione dei campioni, sono stati realizzati con Visual Basic della Microsoft con base dati in Access. Gli applicativi sono tutti multiutente e possono essere installati su qualsiasi Client del laboratorio.

Risultati. Si sono osservati:

- notevole riduzione dell'impiego di risorse, con diminuzione dei tempi di reperimento dei campioni grazie alla rintracciabilità immediata,
- diminuzione di contestazioni da parte degli utenti,
- maggiore flessibilità del lavoro,
- maggiore soddisfazione degli utilizzatori,
- vantaggio della qualità percepita dal malato, per riduzione dei TAT medi.

Conclusioni. Il sistema da noi costruito, che mette in stretta interazione un LIS del commercio con gestionali home-made, ha migliorato le performance globali del nostro laboratorio in termini di affidabilità, efficacia, come efficienza e qualità, fornendo una soluzione alle esigenze, del clinico, del malato.

UNA RETE DI LABORATORI OVVERO UN LABORATORIO IN RETE

Zanardi V., Zaffagnini P., Benini F., Staffa C., Francesconi L., Mazzotti A.

Laboratori analisi di Lugo, Ravenna, Faenza, AUSL di Ravenna via De Gasperi 8, 48100 Ravenna

L'AUSL di Ravenna assiste circa 300.000 abitanti, ha tre presidi ospedalieri: Ravenna: 450 posti letto; Lugo: 320 posti letto e Faenza: 300 posti letto

I tre laboratori, legati ai presidi ospedalieri, hanno intrapreso, nel 1997, un percorso di riorganizzazione che, dopo la prima tappa, oggi portata a termine, li ha trasformati in un unico laboratorio con tre sedi.

Prima fase:

- Acquisizione di softwares gestionali uguali
- Acquisizione di uguale strumentazione per test di base
- Unificazione del referto e dei valori di riferimento
- Collegamento in rete geografica in modo tale che gli strumenti automatici possano essere collegati bidirezionalmente, in tempo reale, con tutti i laboratori
- Collegamento intranet fra reparti ospedalieri e relativi laboratori con un server comune in modo che uno stesso paziente potesse essere trasferito da un ospedale all'altro mantenendo evidenti i propri dati analitici.

Seconda fase:

- Allocazione in uno solo dei tre laboratori degli esami di "secondo livello" e precisamente:
- Ravenna: immunometria, microbiologia, citofluorimetria, tossicologia;
- Faenza: autoimmunità, allergologia;
- Lugo: sierologia, diagnostica liquorale.

Problemi superati:

- Convergenze culturali dei dirigenti e del personale dei laboratori per unificare metodiche analitiche e referto.
- Educazione permanente degli infermieri dei reparti all'uso del computer per un efficiente collegamento in rete con i laboratori
- Riconversione del personale a specialistiche diverse da quelle seguite per anni
- Efficiente rete di navette fra i tre ospedali (spesa: circa 70.000 euro l'anno)

Risultati:

- Dal 97 ad oggi: quindici unità lavorative in meno (da 166 a 151) ed un milione di euro in meno di spesa annua per reagenti (da circa 8 a circa 7)
- Aumento del case-mix con introduzione di nuovi esami specialistici e con sostanziale costanza del numero di esami annuo.
- Esecuzione giornaliera di molti esami prima a cadenza infrasettimanale
- Mantenimento nei tre laboratori delle risorse umane sufficienti per far fronte ai turni di pronta disponibilità ed all'assistenza informatica ai reparti collegati.
- Esami di base (ematologia, chimica, coagulazione) visibili e stampabili nei reparti nella mattinata stessa del prelievo.

Prossime tappe: dipendenti dai progetti dell'"area vasta della Romagna"

Bibliografia: Bruce A.F: Clin.Chem. 2001; 47:1526-35

STRATEGIE DI LABORATORIO TRA APPROPRIATEZZA, LINEE GUIDA E RISPARMIO

Dal Checco P., Tait M., Peer E., Pietrogiovanna A., Daves M., Floreani M., Cosio G.

Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

Oggi il Laboratorio viene spesso scambiato per un supermercato su cui si riversa un'immotivata e frenetica richiesta di esami che riconosce varie cause quali: il poco spazio dedicato alla valutazione delle performance dei test diagnostici in sede di formazione universitaria e di aggiornamento, la prudenza del medico per una maggior tutela medico-legale, la disponibilità del medico ad assecondare richieste di pazienti insistenti, la diffusione di tecnologie avanzate e non ultima la mancata consapevolezza negli utenti del peso degli esami in termini di costi, carico di lavoro e tempi di esecuzione.

L'uso indiscriminato di test diagnostici scatena un meccanismo a cascata con gravi ripercussioni sull'efficienza ed efficacia dell'assistenza sanitaria. Infatti, l'elevato numero di indagini richieste determina una congestione dei servizi con allungamento sia dei tempi di degenza che di attesa, inoltre i risultati falsamente positivi, la cui frequenza cresce esponenzialmente col numero di test richiesti, è fonte di una serie di indagini inutili con aumento dei costi e di apprensione per il paziente.

Le richieste inappropriate di test diagnostici possono essere modificate grazie alla linea guida (LG), a condizione che vengano rinforzate da adeguate strategie d'implementazione: modifiche ai moduli di richiesta (MM) e/o disposizioni di politica sanitaria. Elaborare LG significa definire quali debbano essere le prestazioni più appropriate per specifiche categorie di pazienti.

Nella nostra realtà si è agito riducendo le richieste di test biochimici quali l'uricemia ed i bicarbonati (MM), il CK-MB massa (LG e MM); riducendo o non incrementando test di funzionalità renale quali l'azotemia e la creatinina (LG e MM), le indagini sui depositi marziali quali sideremia, TIBC e ferritina (LG); eliminando il marcatore neoplastico MCA (LG).

Concludendo si è pensato in futuro di avviare la ricerca dell'appropriatezza nella diagnostica di laboratorio come "progetto aziendale", mediante la creazione di gruppi di lavoro multidisciplinari, il cui coordinamento organizzativo sia affidato al Dipartimento di Medicina di Laboratorio con l'individuazione di un responsabile del progetto. Il monitoraggio del progetto, la ricerca degli indicatori, sono compito del Dipartimento nella figura del responsabile del progetto.

1) Rizzotti P. "La Medicina di Laboratorio tra appropriatezza, linee guida e consumismo sanitario" Riv Med Lab - JLM, Vol. 2, S.1, 2001

ESPERIENZA DI UN CORE-LAB NELLA REALTÀ OSPEDALIERA

Maiavacca R., Felicetta I., Pietropaolo A.M., Tirelli A.S., Rossi G., Giavardi C., Torresani E.

Laboratorio di Chimica Clinica, Clinica del Lavoro, I.C.P., Milano

La proposta di un nuovo modello organizzativo per il Laboratorio della nostra A.O., con un volume di produttività di circa 2 milioni di analisi/anno, nasce dall'esigenza di: rendere il laboratorio maggiormente "efficiente" con una riduzione del personale impiegato e del costo dei diagnostici e con un aumento della produttività mediante l'impiego dell'automazione analitica, preanalitica e dei sistemi informatici a fronte della diminuzione della quantità di materiale biologico necessario, e maggiormente "efficace" mantenendo la differenziazione culturale dei vari professionisti nelle relazioni coi clinici. Basandosi su questi presupposti ci siamo impegnati nella realizzazione di un "core-lab", un sito produttivo ad alta automazione che permetta di superare: (1) limite organizzativo dei laboratori di base autonomi (biochimica, microbiologia, ematologia) con sovrapposizione di linee analitiche e di strumentazione, (2) antitesi tra routine e urgenza consolidando le due attività sulla stessa linea analitica con riduzione del t.a.t. e con l'allestimento di idonei "point of care", (3) il concetto di accentramento mantenendolo solo per l'attività di analisi, ma incentivando il numero dei punti prelievo anche decentrati. Il progetto è passato attraverso una fase di approfondimento con il coinvolgimento dei vari attori del processo di trasformazione e con obiettivi specifici atti a valutare lo stato dell'arte e a verificare la fattibilità delle innovazioni (approvvigionamenti, valutazione economica, marketing, spazi, informatica, trasporti, risorse). I risultati di questa analisi hanno confortato la validità degli obiettivi prefissati. Siamo quindi passati alla fase di acquisizione della strumentazione mediante "appalto concorso" che ci ha permesso di ottenere dal mercato risposte in termini progettuali e che si è concluso con l'aggiudicazione al progetto della ditta ROCHE che prevede: automazione della fase preanalitica (1PSD+1PAM), consolidamento della fase analitica (1Modular 3P+ 1 Modular 2E). Questa scelta ha permesso un risparmio del 30% rispetto alla fornitura precedente. L'installazione della strumentazione e l'interfacciamento al software di gestione del processo (PSM) con il LIS ha richiesto circa due mesi di lavoro comprensivi anche dell'istruzione sul personale. A regime, per l'esecuzione degli esami contemplati nel progetto core-lab ed appartenenti ai settori di biochimica e urgenza, sierologia, endocrinologia e farmacologia, sono necessarie 5 unità di personale tecnico.

C. Franzini " *appunti per un modello organizzativo di Laboratorio di analisi mediche basato sulla integrazione di Tecnologie*" *Comunicazione personale SIBioC 2000*

IMPATTO DELL'ACCESSO DIRETTO SUI FLUSSI LAVORATIVI IN UN LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA DISTRETTUALE

Vecchi E., Vagnini C.*, Leonardi R**, Trenti T.**

Scuola di Specializzazione in Igiene, Università di Modena; *Distretto di Pavullo n/F (Mo); **Servizio di Patologia Clinica di Pavullo n/F (Mo)

L'obiettivo dello studio è stato di analizzare i flussi settimanali dei campioni relativi a pazienti esterni e in particolare l'impatto dell'accesso diretto alle prestazioni di laboratorio in un Servizio di Patologia Clinica che presenta tempi di attesa annullati. L'intento è modulare il carico di lavoro giornaliero al fine di aumentare l'efficienza del personale e degli strumenti del laboratorio. I dati sono relativi a pazienti esterni che hanno eseguito esami di laboratorio nel periodo di settembre e ottobre 2001 presso il Servizio di Patologia Clinica di Pavullo nel Frignano che soddisfa la quasi totalità delle richieste di diagnostica di laboratorio del distretto montano della provincia di Modena. Come fonte si sono usati i dati correnti provenienti dal sistema informatico del Centro Unico Prenotazione (CUP) distrettuale. I dati ottenuti sono stati divisi secondo: il numero di prenotazioni giornaliere a CUP; i pazienti/die in accesso diretto; il totale dei pazienti esaminati. Di ogni distribuzione si sono calcolati i valori medi e le deviazioni standard. Si è inoltre esaminato il ricorso alla prenotazione telefonica. L'analisi evidenzia che il lunedì si ha un numero mediamente più alto di pazienti prenotati a CUP (ds 2.63 in sett. e ds 1.63 in ott.) e del totale dei pazienti esaminati. Di quest'ultimi la ds minore è presente al venerdì (ds 3.51 in sett. e ds 4.32 in ott.). I pazienti in accesso diretto sono in media più numerosi il martedì e il venerdì. L'Indice di Utilizzo della Disponibilità, dato dal rapporto tra il numero dei pazienti prenotati e la disponibilità dei pazienti esaminabili dal Laboratorio, è più elevato il sabato con il 100% di utilizzo posti, mentre il più basso è il venerdì con solo il 75.97% di utilizzo posti disponibili. La percentuale dei pazienti che usufruiscono della prenotazione telefonica è del 25.82% sul totale dei prenotati; tra i pazienti prenotati e non venuti solo il 26.91% hanno prenotato per telefono. In conclusione, il lunedì è il giorno più sfruttato, mentre i giorni centrali della settimana risultano avere un carico lavorativo di minore entità e sono più soggetti a fluttuazioni. Alla riduzione dei tempi di attesa segue quindi una tendenza verso l'accesso diretto alle prestazioni di laboratorio che rende molto più evidente le fluttuazioni giornaliere con evidente ritorno sull'attività analitica. La conseguenza è rimodulare l'attività di richiesta diagnostica oppure l'attività lavorativa finalizzata alla gestione di carichi lavorativi diversi nel corso della settimana.

L'IMPORTANZA DELLA FORMAZIONE CONTINUA IN
MEDICINA DI LABORATORIO

Zepponi E.*, Villani A., Scutellà M., Russo R., Sebastiano C., Bucci M.

Laboratorio Analisi P.O. "G. Vietri"- Larino (CB) ASL n° 4 Basso Molise; * Laboratorio Analisi P.O. "S. Camillo de' Lellis" ASL di Rieti

Il Laboratorio di analisi di Larino, in collaborazione con la SIBioC e con l'AMCLI ha organizzato un corso di aggiornamento in Medicina di Laboratorio in otto lezioni a cadenza settimanale (dal 15 aprile al 31 maggio) secondo quanto previsto dalla normativa vigente riguardante la ECM (Educazione Continua in Medicina) a regime dal 1 gennaio 2002. Il corso ha ottenuto 25 crediti per i laureati e 31 crediti per i tecnici.

Nella lezione sui *lipidi plasmatici*, tenuta il 6 maggio, i 71 partecipanti sono stati sottoposti a un pre-test e ad un post-test prima e dopo l'ascolto della relazione.

Il questionario conteneva le seguenti tre domande a risposta multipla: A) nella valutazione del rischio cardiovascolare vengono utilizzati: 1) gli intervalli di riferimento del colesterolo, 2) i valori decisionali del colesterolo, 3) i valori ottenuti in precedenza sullo stesso paziente. B) Quando il valore di un parametro, confrontato con il risultato precedente, presenta una diminuzione significativa?: 1) quando differisce del 5%; 2) quando differisce del 10%; 3) quando è superiore alla differenza critica. C) In un paziente senza altri fattori di rischio quale è il valore del Colesterolo LDL che non richiede un intervento dietetico o farmacologico?: 1) maggiore o uguale a 160mg/dL; 2) maggiore o uguale a 130 mg/dL; 3) minore o uguale a 115 mg/dL.

Per la prima domanda si sono ottenute 53 risposte esatte prima della lezione e 66 dopo; per la seconda domanda si sono ottenute 55 risposte esatte prima della lezione e 66 dopo; per la terza domanda si sono ottenute 52 risposte esatte prima della lezione e 67 dopo. Per quanto concerne gli errori, nel pre-test, 11 partecipanti hanno dato come giusta la terza risposta alla prima domanda; 15 partecipanti hanno dato come giusta la seconda risposta alla seconda domanda; 17 partecipanti hanno dato come giusta la seconda risposta alla terza domanda.

In conclusione si è vista l'importanza dei corsi di formazione in quanto anche un argomento classico come quello riguardante lo studio dei lipidi plasmatici ha mostrato che nel pre-test il 25% circa delle risposte erano errate e pertanto i partecipanti avevano bisogno di approfondire e migliorare le proprie conoscenze soprattutto a livello di appropriatezza della richiesta e di interpretazione del dato, fasi in cui l'attività di consulenza dello specialista di laboratorio deve consolidarsi nell'interesse generale della professione.

Bibliografia: Catapano A.L., Franzini C., Galli G., et al.: Linee guida per la refertazione dei livelli plasmatici di lipidi e lipoproteine. *Biochimica Clinica* 2001 25: 283/288

VALUTAZIONE DEL FLUSSO DI LAVORO IN
EMERGENZA METODOLOGIE DI MIGLIORAMENTO
DEL TAT

Di Serio F., Brescia V., Varraso L., Matarrese A., Mazzarella A., Pansini N.

U.O. Patologia Clinica I, Azienda Policlinico, Piazza G. Cesare 11, 70124 Bari

Obiettivi: lo scopo del nostro studio è stato di valutare l'analisi dei flussi di lavoro in emergenza, identificare aree di debolezza nelle differenti fasi operative (pre-analitica, analitica, post-analitica) e predisporre idonee azioni correttive al fine di ottenere un decremento del TAT in emergenza.

Metodologie: in riferimento agli anni 2000-2001 il LIS è stato implementato al fine di poter fornire accurate indicazioni statistiche correlate ad indicatori della fase preanalitica (tempo di prelievo e di accettazione) analitica (tempo di esecuzione) postanalitica (tempo di validazione ed osservazione). I dati ottenuti in riferimento alla tipologia di domanda (Emergenza, Priorità, Routine) è stata valutata.

Risultati:

analisi del TAT in emergenza (h,min)

	Years	Admittance time	Execution time	Validation time	Evaluation time	TAT
Pannello di chimica clinica (urea, Na, K, glucosio)	2000	0.33	0.15	0.07	0.36	1.31
	2001	0.27	0.15	0.05	0.18	1.05
Test ematologici	2000	0.04	0.05	0.07	0.29	0.44
	2001	0.04	0.05	0.06	0.28	0.45
Marcatori miocardici (cTnI, Myo, CK-MB)	2000	0.33	0.18	0.08	0.38	1.39
	2001	0.23	0.17	0.04	0.14	0.58
Test di coagulazione (PT, APTT)	2000	0.12	0.07	0.18	0.16	0.53
	2001	0.15	0.09	0.19	0.20	1.03

analisi del flusso in emergenza

Fascia oraria	Pratiche	Analisi
8.00 - 14.00	36.83 %	29.85 %
14.00 - 20.00	22.02 %	22.32 %
20.00 - 08.00	41.15 %	47.83 %

Conclusioni: la possibilità di aver identificato aree di "debolezza" operativa ci ha permesso di attuare processi di modifica nelle differenti fasi:

- preanalitica: identificazione di U.O. a cui fornire maggiore informazione inerenti le modalità di prelievo ed appropriatezza della richiesta

FOLLOW-UP NEL POST-TRAPIANTO DI RENE: LINEE GUIDA E PROCEDURE

Rossi L., Lucchetti A., *Paleologo G., *Tregnaighi C., Ceccarelli L., *Rizzo G, Rindi P., Innocenti B.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, U.O. Nefrologia con Trapianti, Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro

Il laboratorio è coinvolto in maniera diretta nel monitoraggio del paziente sottoposto a trapianto di rene, assistendo il clinico mediante la determinazione dei parametri biologici tipici nella valutazione della compliance del paziente trapiantato. Il follow-up di questi pazienti occupa un servizio importante, assistendo circa 350 persone provenienti prevalentemente da fuori provincia. Al fine di coordinare e quindi agevolare lo svolgimento delle tappe che compongono questo percorso assistenziale, è stato messo a punto un protocollo di accesso facilitato, regolato da linee guida e procedure. L'attivazione di un canale preferenziale di prelievo, accettazione anagrafica e smistamento provette consente di iniziare immediatamente la fase analitica: i pazienti, entro le ore 9, si presentano al Centro Prelievi con la richiesta di esami compilata dai medici dell'Ambulatorio di Nefrologia e si recano ad uno sportello dell'accettazione dove non occorre numero di accesso, e da questo all'ambulatorio dedicato per sottoporsi al prelievo di sangue. Gli esami specifici del trapiantato (ciclosporina o tacrolimus, creatinina, urea, creatinuria e azoturia con relative clearance, emocromo completo) vengono eseguiti in regime di routine accelerata utilizzando una scheda con codice dedicato; gli altri esami generali (glicemia, transaminasi, alp, ggt, colesterolo, trigliceridi, acido urico, elettroliti, elettroforesi, urine ed urinocoltura), vengono eseguiti con l'apertura di una seconda cartella.

Risultati

La refertazione degli esami necessari al monitoraggio e all'eventuale aggiustamento della terapia antirigetto (gli esami eseguiti in routine accelerata) avviene entro le ore 11; l'esecuzione delle rimanenti analisi, per la completa valutazione di controllo dei pazienti, avviene entro le ore 15. Con una organizzazione di questo tipo è possibile garantire l'espletamento del follow-up, sulla prima trince di esami disponibili (ore 11) nella mattina, anche nell'eventualità che si rendano necessari interventi diagnostici strumentali. I referti vengono acquisiti on-line, attraverso una rete intranet ospedaliera, dall'ambulatorio di nefrologia, prima di essere inviati, in originale, al reparto attraverso il servizio interno ambulanze.

Discussione e conclusioni

Seguendo queste linee guida ed attenendoci a procedure semplici e facilmente attuabili siamo riusciti a sviluppare ed ottimizzare un servizio di grande utilità nella gestione di un paziente difficile, che necessita di un monitoraggio accurato e continuo in cui il Laboratorio ricopre un ruolo determinante.

CONFRONTO DEI DOSAGGI DI FENILALANINA E DI TIROSINA ANALIZZATI IN TANDEM MASSA E IN RP-HPLC

Goffredo B.M., Rizzo C., Boenzi S., Pezzi S., Cotugno G., Dionisi Vici C., Federici G.

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù I.R.C.C.S. – Roma

La fenilchetonuria da deficit dell'enzima Fenilalanina Idrossilasi (PAH) è la patologia più frequente tra gli errori congeniti del metabolismo; una diagnosi precoce ed il successivo follow-up, basato sul dosaggio della fenilalanina (Phe) e della tirosina (Tyr) nel plasma, sono importanti per evitare effetti secondari come ritardo neurologico del paziente.

Sulla base dei livelli e della tolleranza dietetica di Phe tale malattia metabolica viene classificata in PKU classica, PKU moderata e HPA lieve.

Abbiamo voluto confrontare i risultati dei valori di Phe, Tyr e dei relativi rapporti Phe/Tyr ottenuti con i due metodi usati nel nostro Laboratorio: la spettrometria Tandem Massa (MS/MS) e l'analisi cromatografica in RP-HPLC.

Il metodo MS/MS prevede l'analisi del campione da sangue su spot con estrazione e butilazione degli aminoacidi e successiva analisi mediante "Flow Injection Analysis" (FIA); in RP-HPLC viene utilizzato plasma in EDTA, gli aminoacidi vengono evidenziati mediante derivatizzazione pre-colonna con orto-ftalaldeide (OPA) e successivamente separati in colonna; il sistema di rivelazione è composto da uno spettrofluorimetro.

Sono stati analizzati in doppio 65 campioni appartenenti a 27 pazienti affetti da fenilchetonuria e/o iperfenilalaninemia. I valori assoluti della Phe e della Tyr ottenuti con le due diverse tecniche non sono confrontabili, poiché i metodi di estrazione e di rivelazione seguono principi chimico-fisici differenti, in particolare i valori di Phe e di Tyr in MS/MS risultano minori rispetto a quelli ottenuti in RP-HPLC; mentre il valore del rapporto Phe/Tyr ottenuto nei due dosaggi mostra una forte correlazione come dimostrato dai risultati dell'analisi statistica utilizzando i coefficienti di correlazione di Pearson: $r_{Phe} = 0.8919$ $p < 0.0001$; $r_{Tyr} = 0.6940$ $p < 0.0001$; $r_{Phe/Tyr} = 0.9394$ $p < 0.0001$

Appare evidente come il valore assoluto del rapporto Phe/Tyr tra i due metodi sia sovrapponibile e significativo sia nella diagnosi che nel follow-up di questa patologia in cui il buon andamento dipende dalla dietoterapia.

F. Ziegler, J. Le Boucher, C. Coudray-Lucas and L. Cynober.

J. of Automatic Chemistry, 14,4,145-149 1992

MESSA A PUNTO DI UN NUOVO METODO HPLC PER LA DETERMINAZIONE DELLA DIMETILARGININA ASIMMETRICA (ADMA) CON DERIVATIZZAZIONE NDA

^aCoppa G., ^bTesta R., ^cMaccaroni I., ^aGambini A., ^aPigini P., ^dPieri C., ^bMarra M.

^aLaboratorio Analisi, Ospedale Regionale, Ancona, ^bU.O. Diabetologia, Dipartimento Ricerche, INRCA, Ancona, ^cLaboratorio Analisi, Ospedale di Recanati, Recanati (MC), ^dCentro di Citologia, Dipartimento Ricerche, INRCA, Ancona.

La dimetil-L-arginina asimmetrica (ADMA) è un inibitore competitivo dell'ossido nitrico sintasi. La diminuzione, nel plasma, del rapporto L-arginina/ADMA è stata associata con l'ipercolesterolemia, l'aterosclerosi, l'insufficienza renale cronica e l'ipertensione. Per questa ragione la determinazione plasmatica dell'ADMA è divenuta una importante procedura diagnostica, che richiede metodi rapidi, precisi e accurati. La naftalene-2,3-dicarbossilaldeide (NDA) si è dimostrato un eccellente reagente fluorogenico per la derivatizzazione degli aminoacidi dovuto all'intensa fluorescenza e stabilità e dei prodotti ottenuti rispetto ai derivati con OPA. Questo lavoro descrive un nuovo metodo HPLC per la determinazione dell'ADMA in plasma eparinato con derivatizzazione NDA e rilevazione fluorimetrica.

Materiali e Metodi

L'ADMA è estratto, a temperatura ambiente, dal plasma eparinato su colonna a scambio cationico forte (Isolute PRS) previa aggiunta di L-omoarginina come standard interno. L'eluato è portato a secco su corrente d'azoto e derivatizzato con NDA, a temperatura ambiente per 20 minuti, in tampone borato a pH 9.5 in presenza di ioni cianuro. Il campione viene iniettato in un sistema HPLC a fase inversa e separato, in isocratica, utilizzando una colonna Waters Spherisorb S5 CN 250x4.0mm e una fase mobile costituita da KH_2PO_4 10 mmol/L, 40% CH_3OH e 1% THF. Il detector fluorimetrico è settato a $\lambda_{\text{EX}}=420$ nm e $\lambda_{\text{EM}}=483$ nm.

Risultati

La linearità è risultata nel range 0.15-15 micromol/L. La precisione within-day è risultata inferiore a 5.2% e la day-to-day inferiore a 6.3%. I recuperi ottenuti da campioni supplementati con standard puro sono maggiori del 85%. I campioni mantenuti a +10°C e protetti dalla luce, sono più stabili di quelli ottenuti con derivatizzante OPA (fluorescenza persa per i derivati NDA ogni 24h 4% vs 72% per i derivati OPA).

Conclusioni

Il nostro metodo ha mostrato una buona affidabilità complessiva e i prodotti ottenuti, a parità di sensibilità, sono più stabili rispetto a quelli ottenuti con l'OPA. È da sottolineare che con tale metodica è possibile analizzare contemporaneamente sia l'ADMA sia l'isomero simmetrico della dimetil-L-arginina (SDMA) e l'arginina.

Referenza Bibliografica

Pi J, Kumagai Y, Sun G, Shimojo N.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000;742(1):199-203

DETERMINAZIONE DELLA RAPAMICINA MEDIANTE HPLC-UV

Ujka F., Bonvicini P., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

In questo studio viene descritto un metodo in HPLC-UV, specifico e sensibile, per la determinazione nel sangue intero della rapamicina, un antibiotico con potente azione immunosoppressiva, con lo scopo di poter monitorare le corrette dosi terapeutiche del farmaco. Purificazione del campione: a 1,0 mL di campione di sangue intero vanno aggiunti 50 μL di standard interno (1000 $\mu\text{g/L}$); dopo vigorosa agitazione aggiungere 1,5 mL di solfato di zinco al 5% e 1,5 mL di acetone. Agitare bene e centrifugare per 5 min a circa 3000 g. Prelevare il surnatante, aggiungervi 2 mL di acqua e versare tutto in colonne C18 (200 mg, Isolute SPE) preconizionate con 1 mL di acetonitrile, 1 mL di metanolo e 1 mL di acqua, e lasciare eluire. Lavare con 1,5 mL di metanolo al 70% in acqua e poi con 500 μL di esano. Aspirare completamente, ed eluire con 1 mL di acetonitrile. Evaporare l'eluato sotto flusso d'aria a 37 °C. Risospendere con 125 μL di fase mobile e analizzare. Analisi: colonna LC18 Supelco a fase inversa (2,1 mm x 150mm, dimensione delle particelle 5 μm) a 55 °C e rivelazione con UV (278nm). Fase mobile: acetonitrile: acqua (60:40). Flusso: 0,45 mL/min. Volume iniettato: 50 μL . Pressione: circa 1,2 Mpsi. In queste condizioni i tempi di ritenzione sono di circa 9 min per Rapamicina e 11 min per lo st. interno.

Imprecisione: nella serie CV% di 9,7 alla concentrazione di 18 $\mu\text{g/L}$, n=10. Ripetibilità per un campione da 40 $\mu\text{g/L}$ CV%= 4,1. Sensibilità: limite di rivelabilità 1 $\mu\text{g/L}$; limite di quantificazione 2 $\mu\text{g/L}$. Linearità: fino a 200 $\mu\text{g/L}$. Ricupero estrazione: 40-50%. Le prove sono state effettuate su campioni di sangue arricchito. Il metodo è risultato più affidabile e semplice rispetto a quello con estrazione liquido-liquido.

HPLC assay with ultraviolet detection for therapeutic drug monitorin of Sirolimus. French DC et al Clin Chem 2001, 47:1316-19

DOSAGGIO CROMATOGRAFICO (HPLC) DELLA LAMOTRIGINA SIERICA IN PAZIENTI CON TERAPIA AGGIUNTIVA DI FENOBARBITALE

Cangiano G.¹, Manera B.¹, Cimmino A.¹, D'Amora M.², Iannucci F.³, Sarappa C.⁴, Vrenna L.¹

ASL NA 1: ¹Dipart. Farm. – Lab. Tossicolog. Riferim. Territoriale; ²Responsab. Area Medicina di Laboratorio; ³Laborat. Patologia Clinica – Distretto 50. Univers. Federico II Napoli; ⁴Ambulat. per la cura dell'epilessia
e-mail: giocangiano@libero.it

La Lamotrigina è un anticonvulsivante che viene somministrato in associazione ad alcuni farmaci antiepilettici (valproato, fenobarbitale, fenitoina, ecc.) per il controllo delle crisi epilettiche.

Il dosaggio cromatografico viene effettuato in HPLC con sistema isocratico a fase inversa sullo strumento Chromat 3 della ditta Biorad, con il relativo kit di Antiepilettici II (fase mobile costituita da metanolo <35% ed acetonitrile, colonna di estrazione a fase inversa contenente 100 mg di silice, reagente condizionante contenente metanolo) ed utilizzando una lunghezza d'onda di 210 nm, temperatura di 40°C e flusso di 1,4 ml/min. In tali condizioni operative il sistema evidenzia coeluzione della lamotrigina con il fenobarbitale.

La determinazione da noi proposta, si serve della stessa strumentazione, degli stessi parametri operativi e dello stesso reagentario apportando però alcune variazioni rappresentate dalla modifica della lunghezza d'onda a 330 nm, del volume del campione (0,2 mL di siero) e dello standard interno (0,2 mL di diazepam 0,5 mg/mL) utilizzati nella fase estrattiva.

I tempi di eluizione dello standard interno e della lamotrigina sono rispettivamente di 2,2 e 2,9 minuti.

Nell'intervallo analitico compreso tra 0,2 e 20 µg/mL di lamotrigina viene evidenziata una buona linearità del metodo ($r = 0,9971$) ed un profilo di imprecisione mostrante un CV% <3%. Le prove di recupero mostrano coefficienti di variazione compresi tra il 106,9 ed il 127,8% (recupero medio del 109,3%). Le prove di precisione nella serie (n=20) e tra le serie (20 giorni lavorativi) mostrano CV% inferiori al 5%.

Il metodo proposto non presenta interferenza con fenobarbitale, non mostra difficoltà nell'estrazione su colonna consente di eseguire la determinazione in un tempo inferiore a 4 minuti permettendo un rapido ed efficace monitoraggio della terapia con lamotrigina i cui effetti collaterali sono spesso imponenti e condizionanti la posologia.

Croci D., Salmaggi A., de Grazia U., Bernardi G. New high-performance liquid chromatographic method for plasma/serum analysis of lamotrigine. *Ther Drug Monit* Dec,23(6):665-8, 2001

AGE-RELATED DIFFERENCES IN CSF NEUROTRANSMITTERS GLYCINE AND GABA

Rizzo V., Moratti R.

Dipartimento di Biochimica, Sez. Analisi Chimico-Cliniche, Policlinico S. Matteo, Università degli Studi di Pavia, 27110 Pavia

Age is known to be one of the most important risk factors for a wide range of neurological diseases. A number of biochemical studies support the hypothesis of age-related oxidative brain metabolism decrease. Animal experiments have suggested that the capacity of the brain to adapt to stress conditions is reduced with advancing age and that aged animals are more vulnerable to ischemic damage than adult ones. Glutamate (GLU), aspartate (ASP) are the main candidates for excitatory neurotransmission of corticospinal pathways and other primary efferent systems, while glycine (GLY), taurine (TAU) and GABA are the major inhibitory transmitters of the cerebellum and spinal cord. An imbalance between excitation and inhibition neurotransmission mediated by these amino acids (AAS) may cause a neuronal damage in response to different insults.

We studied the cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of above neurotransmitters in order to accurately characterize the AAs profile in old age normal subjects, and to evaluate the significant influence of age on CSF free AAs.

CSF samples were collected by lumbar puncture from 40 middle age reference subjects (mean age 39.2 ± 8.9) and from 22 elderly subjects (mean age 74.8 ± 6.7) with discal herniation. After a deproteinization step, the above AAs were determined using an HPLC analysis with o-phthalaldehyde pre-column derivatization and fluorescence detection (1).

Compared to younger subjects, elderly subjects exhibited significantly (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$) higher levels of both GLY ($9,23 \pm 1,77 \mu\text{M/l}$ vs $6,45 \pm 2,18 \mu\text{M/l}$ of reference subjects) and GABA ($3,32 \pm 1,1,13 \mu\text{M/l}$ vs $0,13 \pm 0,05 \mu\text{M/l}$), while no differences were documented between the two groups for CSF levels of ASP ($0,35 \pm 0,20 \mu\text{M/l}$ vs $0,31 \pm 0,16 \mu\text{M/l}$), GLU ($1,65 \pm 3,56 \mu\text{M/l}$ vs $0,28 \pm 0,14 \mu\text{M/l}$) and TAU ($5,61 \pm 1,50 \mu\text{M/l}$ vs $6,19 \pm 1,85 \mu\text{M/l}$). The data presented suggest the age-dependency of the CSF levels of inhibitory AAs, GLY and GABA. This may support the presence of an unbalance between excitatory and inhibitory stimuli which has already been demonstrated in several chronic neurodegenerative disorders, and may reflect age-related differences in CNS functions.

1) Rizzo V., Anesi A., Montalbetti L., Bellantoni G., Trotti R., Melzi d'Eril G.V. *J. Chromat. A* 729 (1996) 229-35

CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD FOR HUMAN SERUM CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN DETERMINATION

Fermo I., *Germagnoli L., *Soldarini A., *Dorigatti F., Paroni R.

Lab. Separative Techniques, IRCCS H San Raffaele, *Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.a, via Olgettina 60, 20132 Milano.

Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) includes the transferrin (T_f) isoforms containing di-, mono, and asialylated carbohydrate residues. Clinical and epidemiological studies evidenced that serum CDT is a sensitive and specific markers of chronic alcohol abuse and for monitoring abstinence (1).

We developed an alternative capillary zone electrophoretic (CZE) method for determining serum CDT, tri-, tetra-, and penta-isoforms using a borate buffer with diethylenetriamine (DETA) as additive.

CDT analysis was carried out with a Beckman P/ACE System 5010, equipped with a monochromatic UV detector set at 200 nm. The fused-silica capillary (67 cm x 50 μ m i.d.) was assembled in a Beckman cartridge (200 x 400 μ m slit aperture).

To set up the assay, the influence of DETA concentration, pH of the running buffer, analytical temperature and voltage were investigated. The optimal conditions found were: 100 mM sodium tetraborate pH 8.4 buffer with 5 mM DETA. Separation was performed at constant voltage of + 25 kV (20 μ A) and the capillary column was thermostated at 40 °C. Applying this procedure transferrin sialoforms were baseline resolved within 16 min. Treatment with neuroaminidase from *Clostridium perfringens* (1.1 U/mg) was used to identify CDT isoforms.

Control serum samples were collected from 50 healthy donors (24 males and 26 females; aged from 25 to 50 years). Relative amount of CDT was expressed as: (A) % of the tetrasialoform- T_f peak area, or (B) % of all the T_f isoforms ranging from asialo to pentasialo. The CDT normal ranges found were: 3.15 ± 0.76 and 2.4 ± 0.5 (mean \pm SD), for A and B respectively.

Comparison between CDT values obtained by our procedure and the "Axis-Shield % CDT" kit (Axis-Shield ASA, Norway) gave: $r=0.644$, $p<0.005$ and $r=0.620$ $p<0.005$ for A and B, respectively.

To conclude the present CZE procedure could be an ideal tool to investigate CDT proteins for clinical or forensic purposes. It can be used as a confirmatory technique to complement the immunometric screening methods used in routine and allows to avoid false positive or negative results due to genetic variants.

1. Alle J. and Sillanauke. Eur J Clin Invest (1999) 29, 899-900.

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI OSSALATO E CITRATO URINARI CON CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Bertucci P.¹, Massoud R.¹, D'Ippoliti M.², Emma F.³, Mozzi A.F.¹, Federici G.¹

¹Lab. Analisi, Policlinico Univ. Tor Vergata - Roma

²Laboratori di Ricerca e ³Divisione di Nefrologia, IRCCS "Bambino Gesù" - Roma

Gli ossalati costituiscono una componente importante nel processo di formazione di gran parte dei calcoli urinari. In caso di ossalosi, l'accumulo di ossalati determina la costituzione di depositi intraparenchimali, che conducono all'insufficienza renale. Il citrato, al contrario, è un importante inibitore urinario del processo di formazione dei calcoli. In caso di ipocitraturia, come nelle acidosi tubulari renali, si formano depositi di calcio nel parenchima renale, che concorrono ad una evoluzione clinica verso la nefrocalcosi e la nefrolitiasi. Per la determinazione di ossalato e citrato nelle urine è stato sviluppato un metodo analitico in cromatografia HPLC a scambio ionico, con rivelatore di tipo elettrochimico. Il campione urinario è diluito ed iniettato direttamente nell'HPLC, e gli anioni presenti vengono separati in una colonna a scambio anionico. La fase mobile è formata da due tamponi: il tampone A è costituito da NaOH 50 mM, mentre il tampone B da H₂O deionizzata. Il flusso è mantenuto costante a 1.2 ml/min, ed è programmato linearmente dal tempo $T_0=0$ con il 2% di tamp. A, al tempo $T_1=18$ min. con l'80% di tamp. A. Per la determinazione quantitativa di ciascun metabolita sono state costruite delle curve di calibrazione, facendo uso di concentrazioni variabili di standards puri, ed ottenendo, per ciascuno, un coefficiente di correlazione lineare $R^2=0.99$. L'analisi quantitativa di ossalato e citrato in campioni urinari ha mostrato una buona correlazione con i valori normali descritti in letteratura. Questo metodo è estremamente sensibile, rapido, poiché non richiede alcuna procedura estrattiva, e presenta una buona riproducibilità, strettamente legata, tuttavia, alle modalità di conservazione del campione.