

INDICI PIASTRINICI NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE TROMBOCITOSI

Napoli P., Montaruli B., Sacchi A., Martini A., Gaido F., Sfriso A., Saitta M.

Laboratorio Analisi Ospedale Evangelico Valdese di Torino

Gli analizzatori automatici per gli esami emocromocitometrici di nuova concezione mettono a disposizione numerosi parametri tra i quali alcuni indici piastrinici a cui non sempre può essere dato un significato preciso dal punto di vista diagnostico.

Numerosi studi hanno indagato il possibile impiego del volume medio piastrinico (MPV) e dell'indice di distribuzione piastrinica (PDW) nella diagnosi differenziale tra trombocitosi reattive o secondarie (TR) e trombocitosi associate a malattie mieloproliferative (MMP).

Scopo dello studio: Con questo studio si è voluto: 1) verificare se gli indici piastrinici (MPV, PDW e PCT) forniti dagli analizzatori automatici permettano di discriminare tra MMP e TR; 2) confermare se la valutazione combinata di MPV, RDW e PLT possa dare ulteriori informazioni nella differenziazione tra pazienti con TR o MMP.

Pazienti e metodi: Sono stati valutati 40 pazienti (25 femmine e 15 maschi) con conta piastrinica $>500 \times 10^9/L$: 20 presentavano una TR e 20 avevano una diagnosi di MMP. L'esame emocromocitometrico è stato eseguito con l'analizzatore automatico PENTRA 120 (ABX Diagnostics, Montpellier).

Risultati: 1) La comparazione delle MMP versus le TR per i tre indici piastrinici classici ha dato i seguenti risultati: a) PLT e MPV sono statisticamente differenti nei due gruppi di pazienti ($P = 0,02 - 0,043$); b) i valori di PDW sono maggiori nel gruppo delle MMP rispetto alle TR ma la differenza non risulta statisticamente significativa. Nonostante queste differenze la zona grigia di sovrapposizione dei diversi indici piastrinici nei due gruppi di pazienti studiati non consentiva in una buona parte dei casi una diagnosi differenziale tra MMP e TR. 2) Utilizzando una regressione lineare multipla abbiamo confermato che nel gruppo delle TR il PDW è correlato all'MPV ed alle PLT ($PDW = -12,5 + 0,006 PLT + 2,9 MPV$; $R = 0,93$, $R^2 = 0,87$). La regressione è stata impiegata per calcolare per ogni paziente un PDW atteso. Il valore così ottenuto è stato utilizzato per calcolare un nuovo parametro indicato come PDW residuo ($PDW_{residuo} = PDW_{osservato} - PDW_{atteso}$). I valori di PDW residuo ottenuti sono risultati statisticamente differenti nei due gruppi di pazienti osservati ($P = 0,0186$). Inoltre l'uso del PDW residuo offre una discriminante migliore tra trombocitosi reattiva ed autonoma: in 17 su 20 pazienti con MMP (85%) il PDW residuo risulta sopra il 95° percentile del valore del gruppo con TR.

Conclusioni: Si conferma il dato che l'interpretazione combinata di PLT, MPV e PDW mediante l'uso del PDW residuo permette di discriminare tra trombocitosi reattiva ed autonoma.

VALUTAZIONE DELLA CONTA PIASTRINICA CON IL TEST IMMUNOPLT CD61 CELL-DYN 4000

Zorzino L., Picozzi M., Sandri M.T.

Divisione di Anatomia Patologica e Medicina di Laboratorio, Istituto Europeo di Oncologia - Milano

L'accuratezza del conteggio piastrinico è un dato di fondamentale importanza nel monitoraggio dei pazienti trombocitopenici.

L'uso di tecnologie impedenziometriche (PLTi) o ottiche (PLTo) ha migliorato la conta piastrinica, tuttavia in condizioni quali presenza di frammenti cellulari, immunocomplessi, microcitosi e conteggi piastrinici $< 10 \times 10^9/L$, l'accuratezza e la precisione non sono sempre sufficienti.

Il test ImmunoPLT CD61 effettuato sul CELL-DYN 4000 (Abbott Diagnostics Division) si basa sui principi dell'immunometria in fluorescenza ed utilizza un anticorpo monoclonale liofilizzato FITC-marcato che lega il CD61, ossia la glicoproteina gpIIIa piastrino-megacariocito specifica.

Sono stati analizzati 60 campioni con conteggio piastrinico $< 20 \times 10^9/L$ provenienti da 43 pazienti (12 maschi e 31 femmine, età media 49 anni $\pm 11,68$) affetti da diverse neoplasie e sottoposti a chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali periferiche. I prelievi in EDTA sono stati processati sui contaglobuli Sysmex SE9000 (TOA Medical Electronics) (PLTi) e CELL-DYN 4000 (PLTo e CD61). Abbiamo ottenuto un'ottima correlazione tra la conta piastrinica con metodo ottico e il test ImmunoPLT CD61 ($r=0,96$), ed una discreta correlazione tra la conta impedenziometrica e CD61 ($r=0,80$).

Da tali risultati possiamo pertanto concludere che il test ImmunoPLT offre dei vantaggi rispetto alla conta piastrinica effettuata con metodo impedenziometrico o ottico nei pazienti con trombocitopenia severa. Infatti, oltre ad essere completamente automatizzato permette di ottenere in tempi molto brevi dei risultati accurati e precisi anche nel caso di campioni critici (piastrine giganti, frammenti cellulari etc.), dimostrando la sua utilità nel processo decisionale che porta alla trasfusione piastrinica.

Bibliografia

Dickerhoff R., Von Ruecker A. Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. Clin. Lab. Haem. 1995, 17, 163-172.

EFFETTI DELL'ATTIVITÀ FISICA SULLA COLESTEROLEMIA: ESPERIENZA SU UN CAMPIONE D'INDIVIDUI ADULTI

Flacco L., Calvarese M., Faricelli R.*, Di Cosmo C.*, D'Amico V.*, G. Nubile*

Medicina dello Sport; *Laboratorio di Patologia Clinica, ASL Chieti-Ortona

L'esercizio di tipo aerobico è in grado di determinare aggiustamenti nella composizione corporea, nelle secrezioni ormonali e nel metabolismo cellulare, soprattutto muscolare, tali da migliorare, ad esempio, il quadro glicemico o i valori dell'uricemia e dell'azotemia, ed orientare i consumi energetici verso l'ossidazione dei lipidi. Sulla scorta di tali considerazioni è stata nostra intenzione ricercare eventuali effetti benefici di un allenamento aerobico protratto su alcuni indici ematologici in particolare colesterolemia totale ed HDL. Abbiamo preso in considerazione 16 soggetti di sesso maschile (età media 54.5 anni) che non presentavano patologie manifeste né dismetabolismi conclamati. Tutti sono stati sottoposti ad indagini ematochimiche con rilievo di colesterolemia totale ed HDL; sono stati quindi suddivisi, mediante randomizzazione, in due gruppi, dei quali il gruppo I è stato avviato ad un programma di allenamento al cicloergometro. Il programma prevedeva lavoro ad intensità progressivamente crescente, dal 50-60% della frequenza cardiaca massima fino al 75-80% della stessa, suddiviso in tre sedute settimanali e protratto per tre mesi. Il gruppo II, invece, ha portato avanti il regime di vita abituale ignorando lo scopo dell'indagine e l'esistenza dello studio. Tra i due gruppi non vi erano differenze significative per quanto riguarda medie e deviazioni standard (DS) calcolate sui parametri al primo prelievo. Al termine dei tre mesi tutti i soggetti sono stati nuovamente sottoposti a prelievo ematico con rilevazione dei medesimi parametri. Tutti i dati sono stati quindi avviati ad analisi statistica mediante calcolo delle medie aritmetiche e delle DS per ciascun gruppo. I risultati hanno evidenziato: differenze non significative, nel gruppo II, per quanto riguarda i parametri rilevati al primo ed al secondo prelievo; differenze significative tra gruppo I e II per quanto riguarda entrambi i parametri al secondo prelievo (colesterolemia tot.: gruppo I 190.00 ± 7.65 mg/dl, gruppo II 223.00 ± 9.93 mg/dl, $p < 0.0001$; col. HDL: gruppo I 49.25 ± 2.43 , gruppo II 40.62 ± 1.60 mg/dl, $p < 0.0001$); differenze significative, nell'ambito del gruppo I, nei valori dei due parametri al primo ed al secondo prelievo (colesterolemia tot.: 231.12 ± 8.85 mg/dl prima, 190.00 ± 7.65 dopo, $p < 0.0001$; col. HDL: 41.00 ± 2.39 prima, 49.25 ± 2.43 dopo, $p < 0.0001$). I risultati riscontrati sottolineano i benefici indotti dall'attività fisica regolare sul quadro metabolico, in particolare lipidemico. Si conclude rafforzando il concetto di sport come prevenzione e dell'importanza, ai fini diagnostici e di controllo, di una stretta collaborazione tra la Medicina dello Sport e la Medicina di Laboratorio.

DIAGNOSI MOLECOLARE DELLA FENILCHETONURIA: UN MODELLO PER IMPLEMENTARE UN SISTEMA PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ PER LE MALATTIE MONOGENICHE

¹Giannattasio S., ¹Lattanzio P., ¹Marra E., ²Zschocke J., ³Lugovska R., ³Pronina N., ⁴Jurgelevicius V., ⁴Stepanoviciute D., ⁴Kucinskas V.

¹CNR-Centro di Studio sui Mitocondri e Metabolismo Energetico, Via Amendola 165/A, 70126 Bari e Trani (BA); ²Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum, Im Neuenheimer Feld 344a, D-69120 Heidelberg; ³Latvian State Medical Genetics Center, 20 Juglas street, LV-1079 Riga; ⁴Human Genetics Centre of Vilnius University, Santariskiu street 2, LT-2021 Vilnius.

Il progetto di ricerca "Molecular Genetic Testing in Phenylketonuria: a Model to Assess the Quality Control System for Monogenic Disease" (MOLGENT) finanziato nell'ambito del programma EU-INCO Copernicus, ha lo scopo di sviluppare uno schema di Valutazione Esterna di Qualità per analisi genetico-molecolari della fenilchetonuria (VEQ-PKU) nei laboratori diagnostici. Questo schema dovrebbe essere compatibile con altri schemi di VEQ già in atto.

Il primo stadio di questo progetto è consistito nello sviluppo di una strategia standard per l'identificazione delle mutazioni del gene della fenilalaninidrossilasi (PAH) basata sull'analisi DGGE, sull'analisi di restrizione e sul sequenziamento diretto del DNA. Sono stati preparati dei protocolli standard per 1) l'analisi DGGE, 2) il sequenziamento del DNA e 3) l'identificazione di routine delle più comuni mutazioni del gene PAH (<http://www.geneticahumana.it/MOLGENT/>). L'analisi dello spettro delle mutazioni del gene PAH nell'Europa meridionale, occidentale ed orientale ha permesso di identificare le 10 mutazioni PKU più frequenti in specifiche popolazioni: gli italiani (IVS10-11G>A, L48S, R158Q, R261Q, P281L, R261X, R252W, delT55, IVS12+1G>A, IVS7+1G>A); i tedeschi (R408W, IVS12+1G>A, IVS1-11G>A, Y414C, R261Q, R158Q, P281L, L48S, I65T, E390G); i lituani (R408W, R158Q, G272X, A403V, R261Q, E280K, R261X, L311P, IVS10-11G>A, IVS12+1G>A).

Il secondo stadio del progetto ha previsto la prima prova dello schema pilota di VEQ-PKU. A tal fine sono stati inviati, ai laboratori partecipanti al controllo di qualità pilota, dei campioni di DNA identificati con un codice e contenenti delle mutazioni del gene PAH corrispondenti a dei fenotipi clinici fittizi insieme a dei formulari di risposta. Gli stessi campioni sono stati inviati a degli esperti esterni. Sulla base dell'analisi dei risultati ricevuti dai laboratori coinvolti nella prima prova di VEQ-PKU, come risultato del terzo stadio del progetto MOLGENT sarà sviluppato uno schema di controllo di qualità aperto a tutti i laboratori europei.

NATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME (EQAS) FOR CARDIAC MARKERS: A TWO-YEAR EXPERIENCE

Sciacovelli L. (1), Zaninotto M. (2), Pagani F. (3), Plebani M. (1,2), Panteghini M. (3) on behalf of the SIBioC-SIMeL WG 'Marcatori di lesione miocardica'

(1) Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto, (2) Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale, Padova, (3) Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia, Italy

The role of cardiac proteins in the diagnosis and management of patients with acute coronary syndromes is now well established and several immunoassay systems for their quantification are commercially available. In 1999, the SIBioC-SIMeL Working Group 'Marcatori di lesione miocardica' proposed a national EQAS in order to verify and monitor the performance of immunoassays used for the measurement of cardiac markers in Italy. The scheme provides the opportunity for participant laboratories to estimate the performance of assays used and also to compare the reference limits and the decision cutoffs adopted in different hospitals. The included analytes are cardiac troponin I (cTnI) and troponin T (cTnT), CK-MB mass, and myoglobin (Myo), determined in a liquid stabilized material prepared from a human serum matrix with the addition of the specific proteins. Participant laboratories (n=83) used ten different platforms for cTnI and CK-MB, 13 for myoglobin, and two for cTnT. During the two years of EQAS execution, an overall improvement of the performance of participant laboratories was obtained. As an example, the interlaboratory imprecision (CV) for the five most popular assays, obtained on the same sample, containing marker concentrations around the clinical decision limits, distributed during two different exercises on years 1999 and 2000 was as follows. Beckman Access: cTnI, from 12.4% ('99) to 7.7% ('00); CK-MB, from 14.1% to 7.7%, and Myo, from 6.0% to 6.9%; Dade Behring Dimension: cTnI, from 18.2% to 14.0%; CK-MB, from 14.7% to 20.0%, and Myo, from 7.4% to 5.3%; Dade Behring Opus: CK-MB, from 26.4% to 29.9% and Myo, from 24.7% to 18.1%; Dade Behring Stratus: cTnI, from 41.8% to 28.3% and Myo, from 11.8% to 4.2%; Roche Elecsys: cTnT, from 19.8% to 10.2%; CK-MB, from 19.3% to 10.4%, and Myo, from 11.5% to 8.2%. Analysis of lab reports demonstrated a wide difference in suggested decision limits, also for laboratories using the same analytical system. 56% of the laboratories used limits which were different from those suggested by manufacturers and 42% of participants declared to adopt a second (lower) decision limit for troponins to diagnose 'minor' myocardial damage in addition to the first one used for infarction diagnosis.

CONCORDANZA DELLA DETERMINAZIONE DELL'ALT NEL DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASFUSIONALE MILANO NORD

Carobene A.¹, Ferrero C.A.¹, Guerra E.¹, Rossini S.², Prencipe L.³, Morra E.⁴, Azzario F.⁴, Mastroianni A.⁵, Notti P.⁵, Ceriotti F.¹

¹Laboratorio di Standardizzazione per la Chimica Clinica, e ²Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, H S Raffaele; ³Laboratorio di Biochimica e ⁴Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, H Niguarda Cà Granda; ⁵Istituto Nazionale dei Tumori, Immunoematologia e Servizio Trasfusionale

Introduzione: I livelli di attività di ALT costituiscono uno dei criteri di accettazione del donatore di sangue. Purtroppo la valutazione dei donatori non è omogenea nei vari centri in quanto due fattori contribuiscono a questa variabilità: il metodo analitico utilizzato e le modalità di definizione dei limiti di accettabilità (cut-off).

Il presente lavoro ha lo scopo di verificare la concordanza fra Centri Trasfusionali limitrofi e la congruenza fra i valori di cut-off utilizzati da ciascuno.

Materiali e Metodi: I laboratori partecipanti sono i seguenti: Laboratorio Analisi dell' H San Raffaele, determinazioni eseguite su Modular Roche, principio analitico IFCC con Piridossalfofosfato (PLP); Niguarda, Hitachi 747 Roche, IFCC senza PLP; Servizio Trasfusionale Niguarda, CX9 Beckman, ECCLS con PLP; Istituto Nazionale dei Tumori, Hitachi 747, IFCC senza PLP; Servizio Trasfusionale dell'Istituto dei Tumori, Refloton Sprint, Piruvato Ossidasi/Perossidasi.

Ai 5 laboratori sono stati distribuiti 4 pool congelati e conservati a -80°C e un materiale di controllo liofilizzato, Precinorm Roche. I laboratori hanno eseguito le determinazioni di ALT in triplicato per 3 giorni consecutivi; agli stessi materiali sono stati assegnati valori target (TV) con metodo di riferimento (IFCC con PLP, 37°C, metodo manuale) con analisi eseguite in doppio per 3 giorni presso il laboratorio di standardizzazione dell' H San Raffaele.

Risultati: l'analisi della varianza mostra come la componente maggiore di variabilità sia attribuibile alla variabilità interlaboratorio. Le correlazioni dei 5 laboratori mostrano bias% dai valori ottenuti con il metodo di riferimento che vanno dal -15% al +10%.

È stato inoltre calcolato, considerando i rispettivi rapporti valore ottenuto/cut-off, che un paziente con attività di ALT a livello intermedio (TV = 48.5 U/L), sarebbe risultato idoneo per 2 centri su 5.

Conclusioni: i risultati ottenuti evidenziano la necessità sia di una maggiore concordanza tra i diversi centri, sia di una più uniforme e adeguata definizione dei valori di cut off dei centri trasfusionali. È in corso una attività di allineamento tra i centri e di definizione degli intervalli di riferimento su cui basare i valori di cut-off.

INSULINO RESISTENZA ED OBESITÀ NELLA SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO (PCOS)

°Bugari G., *Gambera A., °Iacobello C.,*Falsetti L., °Albertini A.

°3 Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Spedali Civili, P.le Spedali Civili 1, 25123 Brescia

*Dip. Ginecologia Endocrinologica Università -Brescia

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è un disordine endocrino presente nel 5-10% delle donne in età fertile, caratterizzata da alterata secrezione di gonadotropine, anovulazione cronica iperandrogenismo e una varietà di effetti metabolici quali obesità, insulino resistenza e anomalie nel profilo dei lipidi circolanti.

Nello studio condotto, dopo definizione dell'assetto ormonale delle pazienti, è stata valutata l'influenza dell'insulino resistenza (IR) e dell'obesità sulla pressione arteriosa e sul rilascio di peptide C e insulina.

Le pazienti con PCOS erano seguite presso il Dipartimento di Ginecologia Endocrinologica.

Tabella. 1

CASISTICA: 201 PCOS (1995 - 1998)

- irregolarità mestruale fin dal menarca
- anovulazione cronica
- iperandrogenismo

Tutte le pazienti sono state sottoposte a misurazione della pressione sanguigna e dosaggi ormonali; sono poi state suddivise in gruppi obese/non obese (Body Mass Index) e per presenza o meno di insulino resistenza (test OGTT). Il gruppo di controllo era costituito da 40 donne con regolare ciclo ovulatorio. I metodi utilizzati: insulina, peptide C, DHEA-s, SHBG analizzatore automatico Immulite 2000 (Medical Systems SpA Genova); LH, FSH, testosterone analizzatore automatico Vitros ECi (Ortho Clin. Diagn. Milano); 17 idrossi-progesterone, androstenedione, testosterone libero, IGFBP-1 kit radioimmunologici DSL (Chematil, Salerno); IGF-I kit radioimmunologico Nichols Inst. Diagn.(Byk Gulden, Milano).

Tabella.2:pazienti con PCOS con e senza IR

| | IR (114) | | senza IR (87) | |
|-----------------------|--------------|------------|---------------|------------|
| | Normali (46) | Obese (68) | Normali (70) | Obese (17) |
| BMI Kg/m ² | 21.3±1.7 | 29.8±1.6 | 21.0±1.8 | 29.3±1.7 |
| Pressione : | | | | |
| Sist. mmHg | 126.6 ± 6.9 | 133.6±6.6* | 115.1±4.2 | 123.1±4.2* |
| Dias. mmHg | 72.8±6.2 | 80.4±7.1* | 71.1±5.3 | 78.2±5.5* |
| Glic. mg/dL | 74.9±6.8 | 80.0±6.3 | 73.9±5.9 | 76.7±4.7 |
| C pep. ng/mL | 2.1±0.7 | 2.8±1.0* | 1.5±0.6 | 2.3±0.9* |
| Ins. uU/mL. | 15.8±2.1 | 22.8±6.1* | 5.7±1.2 | 6.9±1.1* |

Dall'analisi dei risultati emerge che:

- insulino resistenza ed obesità aumentano la pressione arteriosa, soprattutto quella sistolica;
- obesità di per sè induce insulino resistenza e tende a dare iperinsulinemia
- obesità e insulino resistenza inducono un aumento della secrezione pancreatica di insulina, infatti si riscontra aumento anche del peptide C.

Fertil. Steril. 1999, vol. 72 32-40

Human Reprod. 1996, vol. 11,n.1 23-28.

LA DETERMINAZIONE DI TROPONINA T 70 ORE DOPO L'INFARTO E' UN'OTTIMA STIMA DELLA FRAZIONE DI EIEZIONE VENTRICOLARE E DELL'AREA DI NECROSI

Pagani F. (1), Bonetti G. (1), Cuccia C. (2), Giubbini R. (3), Bonini E. (2), Panteghini M. (1)

(1) Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, (2) Cattedra-Divisione di Cardiologia, (3) Servizio di Medicina Nucleare, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili'-Università degli Studi, Brescia

L'estensione dell'area di necrosi dopo un infarto miocardico (IMA) è tradizionalmente valutata mediante lo studio della curva di rilascio plasmatico di CK-MB. In questo lavoro è stata studiata la possibilità di utilizzare a tal fine una singola determinazione di troponina T cardiaca (cTnT), effettuata nel giorno di dimissione dall'Unità Coronarica (UCC). Sono stati studiati 34 pazienti con IMA ricoverati entro 4 ore (range, 0.5-38 ore) dall'insorgenza dei sintomi, nei quali la funzione ventricolare sinistra era valutata mediante 'gated SPECT imaging' e l'estensione dell'IMA mediante la concentrazione di CK-MB al picco e mediante il difetto di perfusione miocardica alla SPECT con Tc-99m sestamibi. La determinazione di cTnT e la SPECT erano effettuate al mattino del giorno di dimissione dall'UCC [tempo dal ricovero (mediana): 68.5 ore, range 37-160]. I campioni di sangue per la stima del picco di CK-MB erano prelevati ogni 6 ore durante le prime 48 ore dall'ammissione. Le determinazioni di cTnT e CK-MB erano effettuate su analizzatore Roche Elecsys. Nei pazienti studiati, l'entità del difetto di perfusione alla SPECT, espressa come % di ventricolo sinistro, era compresa tra 0% e 63% (mediana, 18.5%), mentre la frazione d'iezione ventricolare sinistra era compresa tra 23% e 58% (mediana, 40%). Era dimostrata una significativa correlazione tra concentrazione di cTnT (mediana 2.30 µg/L, range 0.18-7.55) e concentrazione di CK-MB al picco ($r=0.74$, $P<0.001$), e tra concentrazione di cTnT ed estensione del difetto perfusivo alla SPECT ($r=0.57$, $P<0.001$). Una concentrazione di cTnT >2.27 µg/L risultava essere predittiva di una frazione di eiezione ventricolare sinistra $<40%$ con una sensibilità del 87.5% [95% intervallo di confidenza (CI): 61.6-98.1] ed una specificità del 83.3% (CI: 58.6-96.2). L'analisi della curva ROC evidenziava un'area sotto curva di 0.847 (CI: 0.682-0.947). Una singola determinazione della cTnT, eseguita nei pazienti con IMA il giorno di dimissione dall'UCC, può essere quindi impiegata nella pratica clinica come una stima conveniente e non invasiva dell'estensione dell'area di necrosi nonché per la valutazione della funzione ventricolare sinistra, mostrando un'attendibilità simile a quella ottenibile con la valutazione del picco della CK-MB (che tuttavia richiede numerosi prelievi sequenziali) o con l'imaging nucleare (troppo costoso per essere impiegato routinariamente).

VIVA: UN NUOVO DOSAGGIO DI FARMACI IN EMITI

Cangiano G.¹, D'Amora M.², Ingala F.³, Vrenna L.¹

Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1): ¹Dipart. Farmacodipendenze – Polo Laboratoristico P.O. “C.Ascalesi”; ²Referente Laborat. Analisi - Direz. Generale; ³Laborat. Patologia Clinica P.O. “C.Ascalesi”

Nel dosaggio di alcuni farmaci abbiamo riscontrato alcune difficoltà operative riconducibili a nostro parere alla breve stabilità dei reagenti EMIT di I generazione commercializzati dalla ditta Dade-Behring, da noi utilizzati sullo strumento Viva sia per il pronto soccorso che per la routine tossicologica (droghe urinarie). Questi ultimi, ottenuti con opportuna ricostituzione dei liofili contenenti l'uno l'anticorpo specifico ed il substrato (G6P e NAD) e l'altro l'antigene marcato con l'enzima (G6PD), mantengono un utilizzo ottimale per circa 3-4 settimane. L'esiguo numero di determinazioni annue effettuate presso il nostro P.O. comporta inevitabilmente un notevole spreco di reagente ed una attenta valutazione delle curve di lavoro (software di elaborazione molto sensibile alle variazioni di stabilità dei reagenti). Col presente lavoro si propone un nuovo procedimento di utilizzo della metodica immuno-enzimatica variato, rispetto a quello consigliato dal Produttore, per la preparazione e la conservazione di reagenti e per i volumi di reazione. I reattivi d'uso vengono preparati aggiungendo 42 ml di Tris diluito (13,3 ml di tamp. conc. e portato a 200 ml con acqua) a 6 ml di reagente ricostituito di anticorpo/substrato (soluz. A) ed a 6 ml di farmaco marcato (soluz. B). Le due soluzioni preparate vengono in seguito divise in frazioni da 6 ml e conservate in freezer. La nuova metodica prevede l'utilizzo di 160 µl di soluz. A, addizionati a 10 µl di campione. Dopo un'attesa di circa 5 minuti lo strumento provvede alla introduzione di altri 160 µl di soluz. B. Il calcolo della assorbanza/minuto alla λ di 340 nm si effettua con rilevazioni a 50 e 106 secondi dall'inserimento della soluzione reattiva B. L'uso del multi-calibratore antiepilettici a 6 punti, consente di evidenziare range analitici fino a 20, 30 ed 80 µg/ml rispettivamente di carbamazepina, fenitoina e fenobarbitale; il multi-calibratore per l'acido valproico consente di dosare concentrazioni fino a 150 µg/ml. L'imprecisione nella serie e tra le serie (n=20), valutate con i controlli tri-level drug della ditta Ortho, non supera il 5% per i farmaci sopra citati. Accettabili risultano le prove di recupero. Il metodo proposto consente di calibrare un'unica volta, all'apertura della confezione, e di eseguire un discreto numero di dosaggi ad un costo contenuto utilizzando di volta in volta, secondo necessità, ridotte aliquote di reattivi.

Cangiano G. Atti del Convegno “Lo stato dell'arte della farmacotossicologia in Campania”. Dade-Behring, 1999

ADOZIONE DEL SISTEMA QUALITÀ PER LE EMOGASANALISI ED ELETTROLITI DECENTRATI

Galzignato O., Guadagnin M., Rocco G., Carraro P., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova

Scopi: scopo del lavoro è la documentazione dell'efficacia del sistema qualità applicato all'emogasanalisi ed elettroliti decentrati.

Metodologia: diciotto analizzatori obsoleti sono stati sostituiti con tredici nuove apparecchiature dotate di ossimetria ed elettroliti. E' stato installato un sistema informatico per il monitoraggio remoto in rete. I materiali di prelievo sono stati sostituiti con altri idonei e sono state prodotte e diffuse procedure operative conformi alle norme ISO 9002 e agli standard CPA. E' stata svolta un'attività di addestramento e valutata l'opinione degli utilizzatori mediante questionari distribuiti prima e successivamente all'installazione. E' stato attivato un sistema di verifica incrociata dei risultati del C.d.Q. e incontri periodici di discussione dei risultati con gli utilizzatori.

Risultati: 1) Il grado di soddisfazione degli utilizzatori è migliorato, 2) l'esecuzione del C.d.Q. è divenuto sistematico nella maggior parte delle installazioni, 3) si sono ridotti gli errori di identificazione dei pazienti, 4) è diminuita la frequenza di campioni coagulati, 5) si è ottenuto un allineamento ottimale con il laboratorio degli elettroliti.

Conclusioni: Si è potuto quindi documentare una maggiore efficienza dei sistemi ed una aumentata accuratezza, in particolare degli elettroliti. Anche la sicurezza nel trattamento dei pazienti critici è passato da una situazione non regolamentata ad una di precisa documentazione di tutte le fasi operative.

STATO DELL'ARTE DELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELLE IgE SPECIFICHE ALLERGOLOGICHE IN PIEMONTE

SIBioC Sezione Piemonte – Gruppo di Lavoro Allergologia: Mazzarello M.G.¹, Ferrari M.¹, Musso M.², Quaglia V.³, Vietti M.⁴, Zanella D.⁵

¹Ospedale di Ovada ASL 22; ²Ospedale di Cuneo ASL15; ³A. O. Maggiore della Carità Novara; ⁴Ospedale G. Bosco ASL 4; ⁵Ospedale Giaveno ASL 5

Scopi/obiettivi: Migliorare e standardizzare l'utilizzo in campo allergologico delle tecniche di laboratorio con la stesura di un protocollo univoco: Laboratori e Clinici.

Metodologia: La prima fase dello studio è stata realizzata con l'invio ai Laboratori della Regione Piemonte di un Questionario al fine di valutare la situazione presente nelle diverse Unità Operative. L'elaborazione delle risposte ha permesso di valutare: strumenti in uso nelle diverse realtà, utilizzo di scheda richiesta e relativa anamnesi, inserimento di CQI e VEQ, modalità di elaborazione/archiviazione dati e prestazioni amministrative. Valutando l'esigenza di operare in stretta collaborazione con i Clinici, è stato trasmesso ad Allergologi, Pediatri, Pneumologi Ospedalieri ed ai Medici di Base Specialisti (unità campione della Regione Piemonte), un secondo questionario relativo alle reali necessità ai fini della diagnosi clinica: conoscenza dell'operatività dei Laboratori, comportamento in caso di richiesta non mirata, utilizzo mix allergeni...

Risultati: I Laboratori della Regione Piemonte che hanno risposto sono stati 33; tenendo conto che molti di essi, a seguito dell'unificazione, eseguono IgE specifiche anche per altri Ospedali, il numero complessivo di realtà contattate è stato 55. L'elaborazione dei dati ha permesso di suddividere i Laboratori, che utilizzano metodiche non manuali (97%), in tre gruppi distinti sulla base della strumentazione adottata: in fluorimmunoenzimatica (64%), in immunoenzimatica (30%), in chemiluminescenza (6%). Tutti i Laboratori (100%) utilizzano CQI durante la seduta mentre, il 68% delle Unità Operative contattate esegue la VEQ. Relativamente al questionario inviato ai Clinici ad oggi, valutando le risposte pervenute (57), si riscontra la necessità dell'invio da parte dei Laboratori dell'elenco degli allergeni disponibili e di referti riportanti valori di riferimento, unità di misura e classi relative.

Considerazioni conclusive: Lo studio è in corso di ultimazione per potere stilare una proposta di protocollo che unisca le necessità di Laboratori e Clinici al fine di migliorare l'efficacia delle prestazioni.

Bibliografia: Pini C. Di Felice G. – *La Diagnostica, i controlli di qualità, le norme in allergologia*. Atti del Convegno "Il network delle malattie allergiche: ricadute sanitarie e socio-economiche". Roma 1998

Romano L. – *La standardizzazione degli allergeni: stato dell'arte* – Atti 102° Corso CEFAR, 1999

VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DI UN MODULAR P/P IN ROUTINE

Bassi L., De Vidovich A., Guerrini M., Lupi R., Ferrari L.

Azienda Istituti Ospitalieri, Viale Concordia 1, Cremona

SCOPO

Scopo del lavoro è stata la valutazione della praticabilità, dell'accuratezza e delle prestazioni analitiche dello strumento modulare Modular (ROCHE) nella configurazione P/P con un modulo ISE. Lo strumento sostituiva due Hitachi 917, per soddisfare la nuova organizzazione del laboratorio legata all'introduzione dei codici a barre, al nuovo sistema informatico ed alla necessità di ridurre la dispersione dei campioni su vari strumenti. Lo strumento analitico consente di effettuare, da un unico campione, esami di vari settori quali chimica clinica, immunochimica, proteine specifiche, farmaci.

MATERIALI E METODI

Per tutti gli analiti è stata valutata la precisione nella serie e tra serie; in quelli di chimica clinica, anche il BIAS% per verificare il grado di accuratezza relativa rispetto al valore assegnato a Precinorm e Precipath. Sono state inoltre valutate le correlazioni per gli analiti che si volevano trasferire sul nuovo sistema e che richiedevano un cambiamento di metodologia analitica.

RISULTATI E CONCLUSIONI

| ANALITA | STRUMENTI | CORRELAZ. |
|---------------|------------|-----------|
| Prot. ur. | Cobas /MOD | 0.9844 |
| Mg. siero | Cobas/MOD | 0.9967 |
| Digossina | TDX/MOD | 0.9831 |
| Fenitoina | TDX/MOD | 0.9861 |
| Fenobarbitale | TDX/MOD | 0.9892 |
| Teofillina | TDX/MOD | 0.9808 |
| A. valproico | TDX/MOD | 0.9680 |
| Carbamaz. | TDX/MOD | 0.9862 |
| IgG | APS/MOD | 0.9907 |
| IgA | APS/MOD | 0.9963 |
| IgM | APS/MOD | 0.9999 |
| C3 | APS/MOD | 0.9490 |
| C4 | APS/MOD | 0.9867 |
| AAG | APS/MOD | 0.9936 |
| AAT | APS/MOD | 0.9950 |
| HPT | APS/MOD | 0.9926 |
| PAB | APS/MOD | 0.9928 |
| ALB | APS/MOD | 0.9925 |

Le correlazioni sono state soddisfacenti soprattutto per quelle chimiche che si volevano trasferire sul nuovo sistema e che comportavano anche un cambiamento di metodologia. Il consolidamento di test biochimici diversi su un unico strumento si rivela una soluzione molto valida riducendo frammentazioni del campione, tempi di calibrazione, di refertazione, di utilizzo del personale e di spese di reagenti.

Bibliografia: Spandrio L. Manuale di laboratorio – Padova 1985, Piccin ed.

VALUTAZIONE DI UN ANALIZZATORE AUTOMATICO PER LA CONTA DEI RETICOLOCITI

Spada M., Gerardi G., Barbarinaldi A.

ASL 5 Regione Basilicata, Servizio di Patologia Clinica – Ospedale Policoro, Viale Salerno, 75025 - Policoro (MT)

Lo studio numerico dei reticolociti, ha una realistica importanza per valutare lo stato dell'eritropoiesi ed è un metodo insostituibile per il monitoraggio dell'attività eritropoietica di un dato soggetto nel tempo.

Tuttavia la conta effettuata al M.O. potrebbe rappresentare un limite alla attendibilità di tale esame, considerate le numerose variabili legate alla soggettività dell'operatore. Il presente lavoro mira a valutare fino a che punto l'automazione possa standardizzare tale indagine.

A tal fine è stato utilizzato un apparecchio automatico per la conta dei reticolociti (Sysmex R-500) che sfrutta i principi della impedenza e dello scattering della luce, mediante l'utilizzo di un colorante capace di sviluppare una fluorescenza proporzionale al contenuto di RNA.

Lo studio è stato eseguito su 400 campioni. Su tali campioni è stata eseguita una prima valutazione con metodica tradizionale al M.O. (UNOPETTE – new methylene blue) e quindi i dati comparati con quelli rilevati dall'analizzatore eseguiti in doppio.

Tali risultati vengono esposti nella Tab. 1

Tab. 1

| Reticolociti ‰ | 10‰ | Tra 10‰ e 30‰ | >30‰ | Totale |
|-----------------------------|------|------------------|------|--------|
| N. campioni | 58 | 269 | 73 | 400 |
| N. risultati discordanti | 1 | 4 | 3 | 8 |
| Discordanza | 1.7% | 1.5% | 4.1% | 2% |

* Il dato è stato definito discordante quando la differenza tra i valori ottenuti con le due metodiche è stata superiore al 5 ‰.

Considerando la totalità dei campioni indagati, i dati ottenuti mostrano una buona affidabilità dello strumento con una discordanza dei risultati del 2 %.

Tale discordanza è risultata essere leggermente più alta nei campioni che mostravano al M.O. una percentuale di reticolociti > 30 ‰. In questa fascia i dati discordanti hanno mostrato una tendenza alla sottostima dei valori.

Tuttavia il giudizio complessivo risulta essere sicuramente positivo, considerata anche l'elevata ripetitività mostrata dall'analizzatore nell'esecuzione in doppio di tutti i campioni. Condizione, quest'ultima, di straordinaria utilità nel follow up dell'attività midollare del paziente diseritropoietico, ancor più se valutata congiuntamente alla differenziazione delle sottopopolazioni (LOW, MEDIUM, HIGT) a diverso contenuto di RNA, facilmente attuabile in automazione.

H. PYLORI AND *p53* GENE MUTATIONS IN THE GASTRIC MUCOSA OF A POPULATION FROM SOUTHERN ITALY

Berloco P., Russo F., °Gentile M., °Cariola F., Di Leo A.

Laboratorio di Biochimica, °Laboratorio di Genetica, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis" v.le della Resistenza, 70013 Castellana Grotte (BA)

Several studies have investigated the evidence for gastric carcinogenesis due to *H. pylori*. In this context, attempts to find possible relations between *H. pylori* infection and *p53* mutations have been made, but the results were contrasting. Mutations of the *p53* gene have been observed in many kinds of malignant tissue such as kidney, colon, and lung. In the gastric mucosa, some authors found in Eastern populations that *p53* gene mutations are detectable in metastases, being a very late event in carcinogenesis (1). On the contrary, other researchers have shown that *p53* abnormalities may occur in pre-cancerous gastric lesions such as atrophic gastritis, intestinal metaplasia, as well as adenomatous polyps. Aims of the study were to assess the presence of *p53* alterations in a population from Southern Italy, and to evaluate whether these anomalies are related with the bacterium genotype.

Patients and Methods: Forty dyspeptic patients who consecutively underwent routine upper endoscopy were recruited. *H. pylori* status was determined by the rapid urease test, histology, and PCR analysis. Detection of *p53* mutations was performed by direct DNA sequencing of exons 5-9. Results: Thirty-five patients had *H. pylori* infection. The prevalence of the *cagA*-positive strain was 65%. In patients with peptic ulceration and/or erosions, *cagA* prevalence was greater than in normal and gastritis patients (83% vs. 52%). As to *vacA* alleles, *s2m2* strains showed a high prevalence among groups (40%). Besides, *cagA* positivity was significantly ($P < 0.0001$) associated with *s1m1* (93%) and *s1m2* alleles (92%). Only 2 point mutations within the *p53* gene were identified among patients: one patient showed normal gastric endoscopy findings while the other had gastritis. The type of nucleotide change was an exon 6 polymorphism (change 648 A → G).

Conclusions: This preliminary study shows no association between *p53* mutations and *H. pylori*-related gastric lesions. Besides, no association was found between *p53* mutations and bacterial genotypes. These findings seem to corroborate the hypothesis that *p53* gene mutations are a late event in gastric carcinogenesis in Western populations.

References: 1) Yamada Y et al. Cancer Res 1991;51:5800-5.

UN POLIMORFISMO DELLA NO-SINTASI (894G/T) E IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Turri O.*, Ghilardi G.***, Bernini M.*, Cecchini F.*, Odero A.***, De Monti M.*, Biondi M.L.*, Guagnellini E.*

*Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedaliera San Paolo, Via di Rudinì 8, 20142 Milano
 ** Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria Ospedale San Paolo - Clinica Chirurgica Generale - Università degli Studi di Milano

L'ipotesi di una componente genetica nella patogenesi della placca aterosclerotica è ormai accertata anche se non è stato trovato un coinvolgimento certo di un determinato gene. E' ormai stabilito il ruolo dell'NO nella regolazione del tono vascolare, dell'aggregazione piastrinica e quindi nella genesi della placca aterosclerotica. Recentemente è stato individuato un polimorfismo nell'esone 7 della NO-sintasi endoteliale (894G/T), che sembra influenzare i livelli di NO circolante ed essere associato a patologie quali l'ipertensione arteriosa e l'infarto del miocardio. E' stato, infatti, ipotizzato che i soggetti omozigoti TT abbiano più alti livelli di NO e quindi una maggiore protezione al danno vascolare. Nel nostro studio sono stati selezionati 127 soggetti (età media 72 anni, range:48-78) affetti da malattia aterosclerotica di diversi distretti vascolari, diagnosticata sia clinicamente che angiograficamente e 133 soggetti di controllo. E' stato applicato un punteggio arbitrario per stabilire la gravità della malattia. E' stato attribuito un punto per ciascun distretto vascolare clinicamente sintomatico o dimostrato angiograficamente colpito; un ulteriore punto è stato attribuito per ciascun intervento chirurgico. Il genotipo, previa estrazione del DNA da sangue intero, è stato determinato mediante PCR seguita da una discriminazione allelica con sonde fluorescenti (TaqMan 7700 Sequence Detection System (SDS); Perkin Elmer/Applied Biosystem). E' stata osservata una significativa differenza nel genotipo tra il gruppo di controllo e quello patologico ($p < 0.01$). Nel gruppo dei pazienti è stata osservata una differenza significativa di punteggio tra il genotipo GG (7.57 +/- 3.2) e quello GT (5.8 +/- 2.7, $p < 0.05$). Nel gruppo dei pazienti è presente un solo soggetto con genotipo TT. Questi dati starebbero per un quadro di malattia peggiore nei soggetti omozigoti GG, in accordo con la differente produzione di NO. I nostri dati confermano l'associazione tra polimorfismo della NO-sintasi e il rischio cardiovascolare.

ESPRESSIONE DI MMP9 E TIMP-1 NEL CARCINOMA POLMONARE

¹Simi L., ²Gigli P., ²Janni A., ¹Pazzagli M., ¹Serio M., ¹Orlando C.

¹Unità di Biochimica Clinica, Dip. di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze e ²U.O. Clinica Chirurgica Toracica, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze

Successivamente alla trasformazione neoplastica, le interazioni fra le cellule tumorali e il tessuto circostante promuovono una serie di processi cellulari e molecolari che determinano il potenziale metastatico del tumore primario. Durante la progressione tumorale, la degradazione dei componenti della matrice extracellulare è richiesta sia per favorire il fenomeno di neoangiogenesi che per agevolare la migrazione delle cellule neoplastiche. L'omeostasi della matrice extracellulare dipende essenzialmente dall'espressione di due diverse famiglie di enzimi: le metalloproteinasi di matrice (MMP) e gli inibitori tessuto specifici delle metalloproteinasi (TIMP). In particolare, sta crescendo un crescente interesse la MMP9 appartenente alla classe delle collagenasi di tipo IV. Tale MMP è stata frequentemente associata ad una maggiore aggressività tumorale nei tumori della prostata e della mammella¹.

Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un dosaggio quantitativo dell'espressione della MMP9 e del suo principale inibitore TIMP-1 in campioni di carcinoma polmonare (NSCLC) e nei rispettivi tessuti sani di controllo. Lo scopo della nostra indagine è stato quello di stabilire se si assiste ad una variazione significativa dei livelli di espressione di MMP9 nei tessuti tumorali e se tale variazione può essere un indice del grado di aggressività della neoplasia. L'indagine è stata effettuata in Multiplex Real-time PCR tramite il metodo TaqMan, mediante l'uso di due specifiche sonde marcate con un diverso fluorocromo. L'extrapolazione dei livelli di espressione dell'mRNA dei geni target è stata effettuata utilizzando come curva standard di riferimento RNA estratto dalla linea cellulare di HT-1080. I risultati sono stati espressi come pg di RNA di HT1080/ μ g di RNA totale. Dai nostri risultati si evidenzia una elevata variabilità nei livelli di espressione dell'mRNA per MMP9 che mostrano, inoltre, un aumento significativo nei tessuti tumorali (media \pm E.S.: $8.9e07 \pm 2.1e07$) rispetto ai tessuti sani ($2.1e07 \pm 4.6e06$), ($p = 0.003$) fenomeno che non si verifica invece per l'espressione di TIMP-1 ($p = 0.06$). Si è osservato, infine, che l'espressione di MMP9 è significativamente maggiore ($p = 0.001$) nei tumori in stadio avanzato e in quelli con interessamento linfonodale ($p = 0.03$).

¹A. R. Nelson, B. Fingleton, M. L. Rothenberg, L. M. Matrisian "Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implication"
 J Clin Oncology 18:1135-49, 2000

STUDY OF GLUTATHIONE TRANSFERASE P1-1 POLYMORPHISM IN NEUROBLASTOMA BY ENDONUCLEASE RESTRICTION MAPPING

¹Ballerini S., ¹Bellincampi L., ^{1,2}Bernardini S., ¹Ardagna F., ²Inserra A., ²Donfrancesco A., ¹Cortese C., ^{1,2}Federici G.

¹Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Rome, ²Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome, Italy.

Glutathione transferases (GSTs) play an important role in the protection of cells from the products of oxidative stress as well as from several environmental carcinogens. Particular interest has been focused on the GST P1-1 class because this gene class is up-regulated during the early stage of oncogenesis and is significantly overexpressed in many human tumors. It has also been shown that high levels of GST P1-1 expression are associated directly with tumor drug resistance and with poor patient survival (1). Several members of the different GST gene classes have been found to be polymorphic. Recently four variants have been described for GSTP1-1 gene (A*,B*,C*,D*) leading to different aminoacid substitutions in position 105 and 114 of the protein sequence. Tissue samples were obtained from 15 patients affected by neuroblastoma. All patients received the same chemotherapeutic protocol: 2 courses of ICE (ifosfamide, carboplatin and etoposide) plus 2 courses of CEcAT (carboplatin, etoposide, cytoxan and thiotepa) as induction were followed by surgery and 1 course each of CAV (cytoxan, adriamycin and vincristine), CE (cytoxan and etoposide) and C (cytoxan) + PBSC (peripheral blood stem cells) harvest, high dose consolidation with ETC (etoposide, thiotepa and cytoxan) and SC (stem cells) rescue; IFN α and *cis*-retinoic acid were administered for 6 months afterwards. Total RNA was reverse transcribed with AMV reverse transcriptase. A 243bp cDNA fragment spanning position +127 to +370 of the GSTP1-1 cDNA was amplified by PCR. The following primers were used: GSTP1-1 forward: 5' TAC CTC AAA GCC TCC TGC CTA T 3'; GSTP1-1 reverse: 5' CAG TGC CTT CAC ATA GTC ATC C 3'. The 243bp RT-PCR product, spanning from exon 3 to exon 6, was digested with and *XcmI*. The endonuclease digestion products were electrophoresed in 2.5% agarose gel, 0.01% ethidium bromide. The GSTP1-1 genotype homozygote A*/A* was identified in eleven patients independent of their response to the chemotherapeutic treatment. Only four patients had a heterozygote genotype A*/B*. Therefore, based on our preliminary data we were not able to conclude that GSTP1-1 polymorphism had an impact on patient response to treatment in neuroblastoma.

1)Zhang K. Int. J. Oncology 1998; 12:871-872.

This study was supported partly by a grant from MURST cofin. and Ministero della Sanità-Italy

SORVEGLIANZA DELLA TAO CON UN SISTEMA POINT OF CARE

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

Dip. di Patologia Clinica, Ospedale Maggiore di Crema

Introduzione: Poter gestire il paziente in terapia al momento stesso del prelievo, grazie ad una valutazione del PT in tempo reale, o porre in condizione pazienti selezionati ed istruiti di autogestirsi la terapia, può certamente snellire l'attività dei Centri di Sorveglianza per il controllo della TAO. Nella nostra Azienda Ospedaliera è in corso un progetto di formazione e aiuto rivolto a pazienti affetti da patologie croniche (diabete, disturbi mentali, malattie tromboemboliche) al fine di consentire agli stessi un livello di "automedicazione" e/o autocontrollo dello stato di malattia. Abbiamo preso in considerazione l'opportunità di collocare in quest'ambito l'utilizzo del sistema COAGUCHEK S per l'analisi "point of care" del PT.

Scopo del lavoro: Analizzare le performance dello strumento COAGUCHEK S e valutarne la possibilità di utilizzo come semplice e veloce alternativa alle procedure convenzionali.

Materiali e Metodi: Il sistema point of care in esame si avvale dello strumento COAGUCHEK S (Roche) e di strisce reattive dedicate. Fornisce il valore del PT su sangue intero venoso o capillare ed esprime il risultato in INR. Il metodo sfrutta i principi della fotometria ottica di riflessione e dell'elettromagnetismo con tempi di risposta di circa 2 minuti. Un gruppo di 107 pazienti in TAO è stato sottoposto ad una doppia valutazione del PT: abbiamo confrontato il dato ottenuto con il metodo convenzionale (su campione di plasma citratato, processato con STAGO Roche) con quello fornito dal sistema COAGUCHEK S (per 47 pazienti su campioni di sangue venoso e per 63 pazienti su goccia di sangue capillare).

Risultati: L'elaborazione statistica ha messo in evidenza una buona correlazione tra i due metodi analitici: in particolare $r = 0,916$ per le determinazioni eseguite su sangue capillare ed $r = 0,831$ per le determinazioni eseguite su prelievo ottenuto da venipuntura. Non vi è differenza statisticamente significativa tra gli INR determinati con i metodi presi in esame ($p < 0.191$).

Conclusioni: I nostri risultati, in sintonia con studi analoghi, confermano che il COAGUCHEK S per le sue caratteristiche tecniche ed analitiche possiede i requisiti di un point of care testing utilizzabile con buona affidabilità sia da personale sanitario in regime ambulatoriale, che dal paziente in condizioni di coagulazione stabilizzata. A seguito di questa esperienza sul campo il nostro Centro, nell'ambito del progetto "Abbi cura di te", sta istruendo un gruppo di pazienti al fine di consentire loro, in un prossimo futuro, l'autocontrollo della terapia presso il proprio domicilio.

Bibliografia: Cromheecke ME, et al.: Oral anticoagulation self-management and management by a specialist anticoagulation clinic: a randomised cross-over comparison. Lancet 2000, Jul 8;356 :97-102

ENDOTHELIAL DAMAGE MARKER PROTEINS IN GLAUCOMA

Volpi R., Paoletti O., Quaranta L.‡, Bettelli S.‡, Pontoglio S., Adinolfi G., Kanso F., Martini G., Del Bono R., Caimi L., Gandolfo E.‡

II Laboratorio Analisi, Spedali Civili, Brescia (Italy)

‡Clinica Oculistica, Università di Brescia, (Italy)

Glaucoma is a progressive optic neuropathy involving characteristic structural changes of the optic nerve and visual field defects. The level of the intraocular pressure is the risk factor most often associated with glaucomatous optic neuropathy. Among the variables other than intraocular pressure, imbalance of endothelial-derived factors seems to play an important role in the genesis and progression of the disease. The aim of the study was to evaluate the presence of endothelial damage in glaucomatous patients by the means of endothelial marker proteins, such as Thrombomodulin and vWillebrand factor. **Methods:** 30 patients were selected (mean age: 69 years; 13 males, 17 females): 16 affected by normal-tension glaucoma (group 1) and 14 with primary-open-angle glaucoma (group 2). Sixteen normal healthy volunteers were enrolled as controls (mean age: 71 years; 8 males, 8 females). Thirteen patients and ten controls had hypertension while six patients and four controls had type 2 diabetes. All patients and controls were tested for plasma soluble Thrombomodulin (sTM), vWillebrand factor antigen (vWf:Ag), Ristocetin cofactor (vWf R:Co) and clotting FVIII (FVIIIc). sTM and vWf:Ag were measured by ELISA immunoassay.

Wilcoxon's test was used for statistical analysis.

Results: Results are given in the Table:

| | Group 1 | Group 2 | Controls |
|----------------------------|-----------|------------|-----------|
| sTM (ng/ml) (mean ± SD) | 8.8 ± 3.7 | 10.3 ± 5.6 | 7.8 ± 5.4 |
| vWf:Ag (%) (mean ± SD) | 126 ± 60 | 107 ± 32 | 132 ± 34 |
| vWR:Co (%) (mean ± SD) | 111 ± 37 | 123 ± 42 | 149 ± 61 |
| FVIIIc (%) (mean ± SD) | 121 ± 22 | 127 ± 27 | 122 ± 23 |

No statistically significant differences were found between patients and controls and between the two groups in all parameters tested.

Conclusion: In this study we found no increase of endothelial marker proteins in glaucomatous patients vs controls and between the two groups of patients. Indeed, endothelium function is impaired in the majority of systemic vascular diseases, such as hypertension and diabetes, which were present in both groups and controls. We can not exclude the presence of an imbalance of endothelium-derived factors in glaucoma considering the prevalence of cardiovascular disease and the high mean age of groups tested.

Haefliger et al. *Surv Ophthalmol* 39: 123-32,1994

Orgul et al. *Curr Opin Ophthalmol* 9:88-94,1998

FAST MEASUREMENT OF REDUCED AND OXIDIZED GLUTATHIONE IN RED BLOOD CELLS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Zinellu A., Carru C., Pes G.M., Marongiu G., Farina M.G., Deiana L., *Tadolini B.

Chair of Clinical Biochemistry and *Department of Biomedical Sciences - University of Sassari, viale S. Pietro 43/b - 07100 SASSARI - ITALY

The measurement in red blood cells of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) is considered essential to evaluate the redox status of cells and tissues. GSH and GSSG measurement in capillary electrophoresis has been developed (1-2). To shorten the preparation time of the samples and the electrophoretic run we developed a new capillary electrophoresis method. Blood was collected from 11 normal subject; red blood cells were prepared by centrifugation (3000xg for 5 min.) followed by three washing with isotonic solution. One volume of packed cells was lysed and deproteinized with trichloroacetic acid (44 g/L). Supernatant was directly analyzed by capillary electrophoresis. We used an automatic P/ACE 5510 Beckman system with a diode array detector. The fused silica capillary dimension was 75 µm ID and 37 cm length. The analysis was performed applying the sample under nitrogen pressure for two sec. (vol. 16 nl) using a sodium borate (300mM, pH 7.8) buffer as electrolyte. The separating conditions of 27 kV were achieved in 30 sec and held at a constant voltage for 90 sec. The separation were carried out at 25°C and detection was performed by UV absorption at 200 nm. The standard curves for GSH and for GSSG were respectively $y=5,3x-0,16$ ($R^2=0,9944$) and $y=1,1x+0,041$ ($R^2=0,9941$). The migration time reproducibility of GSH and GSSG was $CV\%=0,00022$ and $CV\%=0,00017$ respectively. The amount and standard deviation of GSH and GSSG in the red blood cells were $2.171 \pm 0.333mM$ and $0.162 \pm 0.04mM$ respectively, and in according with Inal TC et al 1996. The proposed method for 1) easy and rapid preparation of samples, 2) short capillary electrophoresis run and 3) high reproducibility of migration time proved to be very convenient for the rapid and accurate detection of GSH and GSSG in red blood cells.

1) Piccoli G. et al. Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. *J Chromatogr A*. 1994 Jul 29;676(1):239-46

2) Messana I et al Determination of S-nitrosoglutathione in erythrocytes by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000 May;21(8):1606-10.

3) Inal T.C. et al. Evaluation of reference values for erythrocyte glutathione. *Clin Chim Acta*. 1996 Dec 30;256(2):189-96.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE D-HPLC DI UNA NUOVA MUTAZIONE DEL GENE LDLR (E579X) RESPONSABILE DI IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

Errigo A., Carru, C., Marchese S., Caddeo S., Deiana L., Pes G.M.

Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari, v.le San Pietro 43/B - 07100 SASSARI – ITALY

L'ipercolesterolemia familiare classica è causata da mutazioni del gene del recettore delle LDL (LDL-r). Ad oggi sono state descritte oltre 600 mutazioni del gene LDL-r, sette delle quali da noi identificate nella popolazione sarda [1]. Recentemente abbiamo applicato la tecnica della cromatografia liquida denaturante (D-HPLC) allo screening delle mutazioni del gene LDL-r. Il promotore e le 18 regioni esoniche sono stati amplificati mediante PCR e l'analisi degli eteroduplex è stata effettuata con un sistema HPLC Waters provvisto di colonna HP Zorbax Eclipse (150x2.1 mm), termostata e rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 260 nm. La fase mobile era costituita da un buffer A=acetato di trietilammonio (TEAA) 0.1 M, pH 7.0 e un buffer B=acetonitrile 25%/TEAA 0.1 M, pH 7.0. Il gradiente lineare è stato fatto variare tra 50% e 58% in buffer B in un intervallo di 5 minuti ad una temperatura di separazione ottimale di 65°C. La T_m dei prodotti di PCR è stata calcolata utilizzando il software reperibile all'indirizzo web: <http://insertion.stanford.edu/melt.html>. È stata identificata una variante nel pattern cromatografico dell'esone 12 in un campione proveniente da una paziente di origine sarda con ipercolesterolemia familiare. L'analisi di sequenza del DNA ha rivelato la presenza di una transversione G>T al nucleotide 1798 (G1798T) che causa la sostituzione di un residuo di acido glutammico (GAG) al codone 579 con un codone di stop (TAG). È una nuova mutazione che determinerebbe la sintesi di un recettore tronco privo del dominio di ancoraggio con la membrana cellulare e quindi non funzionale (allele nullo). L'analisi di sequenza ha rivelato anche la presenza nello stesso esone dell'allele T del polimorfismo C1725T. Dato che la mutazione E579X elimina un sito di taglio specifico per l'enzima *MnlI* è stato da noi messo a punto un test rapido per lo screening della mutazione. Lo studio dei familiari con tale metodo ha consentito l'identificazione di 5 ulteriori soggetti (3 sorelle e 2 figli) portatori della stessa mutazione.

[1] L. Deiana et al. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20(1): 236-243.

TROPONINA T, I E CK-MB NEL SANGUE FUNICOLARE DI NEONATI E LORO MADRI

Cappelletti A.¹, Zaninotto M.¹, Altinier S.¹, Mion M.¹, Trevisanuto D.², Zanardo V.², Plebani M.¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, ²Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova

Scopo dello studio è stato valutare se le concentrazioni di CK-MB, TnT e TnI risultino significativamente diverse a seconda del tipo di parto e se forniscano informazioni sul grado di sofferenza cardiaca nei nati da parto cesareo d'urgenza. Sono stati studiati 62 neonati: 19 da parto vaginale, 21 da taglio cesareo elettivo, 22 da taglio cesareo urgente. I tre gruppi erano omogenei per peso alla nascita e indice di Apgar, ma non per età gestazionale, essendo presenti nell'ultimo gruppo anche neonati pre-termine (media±DS: 35±9 s.g.). Sono stati prelevati campioni da sangue funicolare fetale e da sangue anticubitale della madre al momento del parto. Sono stati utilizzati i seguenti metodi: TnI (µg/L) e CK-MB (µg/L), immunometrico applicato su RxL Dimension, Dade Behring; TnT (µg/L), immunometrico di 3^a generazione applicato su Elecsys 2010, Roche Diagnostics (sensibilità analitica TnI: 0.04 TnT: 0.01). La TnI è risultata non dosabile sia nei neonati che nelle madri; la TnT è risultata non dosabile nelle madri. Riguardo ai neonati: le concentrazioni di TnT e CK-MB non sono significativamente diverse tra parti vaginali e tagli cesarei elettivi; i valori di TnT (mediana; 25°-75° percentile) sono significativamente più elevati nei tagli cesarei urgenti (0.025; 0-0.053) rispetto ai parti vaginali (0; 0-0.02) (p=0.026 Mann-Whitney), ma non rispetto ai tagli cesarei elettivi (0.010; 0-0.02); i valori di CK-MB sono significativamente inferiori nei tagli cesarei urgenti (4.01; 2.79-4.89) rispetto ai parti vaginali (6.02; 5.07-7.48) (p=0.002 Mann-Whitney) e ai tagli cesarei elettivi (5.81; 4.94-7.92) (p=0.001). Riguardo le madri, si evidenziano valori di CK-MB più elevati nei parti vaginali (4.96; 2.86-6.28) con differenza significativa rispetto ai tagli cesarei elettivi (1.86; 1.4-4.05) (p=0.006 Mann-Whitney) e urgenti (1.51; 1.02-1.82) (p=0.0008 Mann-Whitney), probabilmente per il maggior rilascio muscolare. Suddividendo i valori di TnT nei neonati da taglio cesareo urgente in 4 gruppi in relazione ai percentili (25°-50°, 50°-75°, 75°-90°, >90°) si nota che all'aumentare della concentrazione aumenta la % di pretermine (0-0.025:17%, 0.026-0.053:25%, 0.054-0.07:66%, >0.07:100%). Tutti i nati da taglio cesareo urgente, inoltre, presentavano delle problematiche legate al parto, ma ugualmente distribuite nei 4 intervalli di valori. Sulla presenza di TnT nel sangue funicolare si possono trarre le seguenti conclusioni: esclusione dell'origine materna della proteina, che infatti nelle madri è non dosabile; possibile rilascio nei neonati dovuto a sofferenza cardiaca legata alle problematiche del parto; presenza fisiologica in età gestazionale più precoce, che sembra l'ipotesi più plausibile.

VALUTAZIONE DELLA CROMOGRANINA A (CgA)
COME MARCATORE CIRCOLANTE DEI TUMORI
NEUROENDOCRINI (NE)

Ferrari L., Seregini E., Martinetti A., Ballabio G., Bajetta E.,
Procopio G., Luksch R., Bombardieri E.

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

Scopi/obiettivi. La CgA è considerata il miglior marcatore circolante per i tumori NE gastroentero-pancreatici (GEP) e per i carcinoidi polmonari. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare il valore della CgA nella diagnosi e nel monitoraggio di pazienti (pz.) con differenti tumori NE. *Metodologia.* La CgA è stata misurata, con metodo immunoenzimatico (DAKO AS), nel siero di pz. con 127 tumori GEP, 49 neuroblastomi (NB), 20 carcinoidi polmonari, 16 microcitomi polmonari, 24 carcinomi midollari della tiroide (MTC), 15 tumori neuroectodermici periferici (pNET), 12 paragangliomi (PG), 7 carcinomi a cellule di Merkel (MCC) e 20 tumori NE a primitività ignota. *Risultati.* La tabella illustra specificità e sensibilità cliniche della CgA nei diversi istotipi tumorali.

| Tumore | Specificità | Sensibilità |
|---------------------|-------------|-------------|
| Tratto GEP | 86% | 37-80% |
| Carcinoide polmone | 67% | 75% |
| Microcitoma polmone | - | 56% |
| NB | 83% | 50-100% |
| MTC | - | 24% |
| pNET | - | 27% |
| PG | 100% | 40% |
| MCC | - | 43% |
| Primitività ignota | - | 75% |

L'accuratezza diagnostica della CgA dipende dallo stadio clinico e dall'estensione di malattia. Nei tumori GEP la sensibilità del marcatore è limitata nella malattia loco-regionale e più elevata nei tumori metastatici al fegato ed al polmone. Nel NB, la CgA risulta innalzata nel 50% dei soggetti in stadio I e II, nel 60% dei pz. in stadio III e nel 100% dei pz. in stadio IV. L'accuratezza diagnostica della CgA nei tumori GEP e nei carcinoidi polmonari è superiore a quella dimostrata dall'enolasi neurone specifica e dall'antigene carcinoembrionale. La CgA risulta utile anche per il monitoraggio dei pz. con tumori NE. Infatti, nei tumori GEP e nel NB, la diminuzione dei livelli di CgA è correlata alla risposta alla terapia. Nei tumori GEP, inoltre, innalzamenti della CgA possono predire una ripresa di malattia a livello epatico. *Considerazioni conclusive.* La CgA è il miglior marcatore per i tumori NE. Infatti: 1) è utile per confermare la diagnosi; 2) i livelli circolanti di CgA riflettono bene lo stato clinico dei pz. con tumori avanzati; 3) le modificazioni del marcatore durante la terapia correlano con la risposta obbiettiva; 4) il valore diagnostico della CgA rimane elevato anche in presenza di tumori NE a primitività ignota.

(Bajetta E., *et al.* Cancer 86: 858-65, 1999).

QUANTITATIVE DETERMINATION OF *sst2* GENE
EXPRESSION IN COLORECTAL CARCINOMA

¹Casini Raggi C., ²Maggi M., ¹Pinzani P., ³Messerini L.,
²Serio M., ¹Pazzagli M., ¹Orlando C.

¹Clinical Biochemistry and ²Endocrinology Units, Dept. of
Clinical Physiopathology; and ³Pathology Unit, University
of Florence, Italy.

Colorectal cancer (CC) is one of the major causes of cancer-related mortality in the western world. Although surgery, adjuvant radiotherapy and chemotherapy were greatly improved in the last decades, the overall cure rates was not improved much. So there is a need for new parameters able to identify subgroups of patients at different risk for recurrence. We used Real Time RT-PCR to measure *sst2* mRNA expression in both cancerous and normal tissue of the same subject, in 100 patients affected by CC. We chose the *sst2* receptor since previous studies have clearly demonstrated that this receptor subtype is prevalent in human CC. All normal and tumoral tissues showed *sst2* expression. Nevertheless, the entity of this expression was quite variable, either in tumoral tissue (range: 7.92×10^5 - 1.2×10^9 molecules/ μ g total RNA), as in normal tissue (2.9×10^5 - 2.8×10^9 molecules/ μ g total RNA). In 28 patients the expression of *sst2* gene was higher in the tumor samples than in corresponding normal tissues, whereas in 46 patients we found opposite results. Despite of the large variability of *sst2* expression in normal tissue, no difference as a function of sex, age, localization, Duke's stage and histopathological grading was detected (ANOVA test, T-test for independent samples). Similarly, in tumoral tissues there was no difference in function of sex, aging, grading and Duke's stage. Significant differences have been observed on the basis of localization: particularly, tumors of the right colon showed mean values significantly lower than tumors of the left colon ($p = 0.034$, t-test for independent samples). T-test for paired samples did not show significant differences of *sst2* expression between normal and pathological tissues ($p = 0.171$). The same for sex, age, localization, stage and grading of disease. Patients with elevated concentration of CEA (> 5 ng/ml) showed a significant difference of *sst2* expression between normal and tumor tissues ($1.91 \times 10^8 \pm 6.48 \times 10^7$ vs $5.45 \times 10^7 \pm 1.79 \times 10^7$, $p = 0.039$) whereas such difference was not found for patients with normal value of CEA (< 5 ng/ml) ($1.61 \times 10^8 \pm 5.45 \times 10^7$ vs $1.14 \times 10^8 \pm 2.86 \times 10^7$, $p = 0.436$) (1). Our results seem to indicate that in CC *sst2* gene expression is not increased in tumors and not related to any assessed prognostic factor. However, the inverse relationship between *sst2* expression in tumor and CEA levels seems to suggest that more aggressive tumors tends to loose *sst2* expression. In conclusion, more advanced stages of CC are, in general, characterized by a loss of *sst2* expression and therefore are probably less sensitive to a SS analogue based adjuvant therapy. Nevertheless, our results do not indicate that SS administration to CC patients is reasonable, because, as an average, concentrations of receptor in the tumor is equal if not lower than the surrounding tissue.

1- Pinzani P et al, Reg Pept (in press, 2001).

EVALUATION OF ANTI ENA AUTOANTIBODY IMMUNOASSAYS: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN WESTERN BLOT METHOD USING HEP II CELLS AS ANTIGENS SOURCE VERSUS IMMUNOBLOT METHOD USING RECOMBINANT ANTIGENS

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

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

The detection in serum of autoantibodies (Aab) that recognises antigenic specificity of the nucleus, cytoplasm or nuclear membrane have great importance in the diagnosis of autoimmune diseases. Different methods, like the Immunofluorescence (IIF), ELISA, Counterimmunoelectrophoresis, Immunoblot (IB), Western blot (WB), are available for this assay. In order to establish the analytical variability between two commercial kits, we have studied two methods: Immunoblot with synthetic or recombinant antigens (*INNO LIA ANA*, Innogenetics, Ghent-Belgium) and Western blot with Hep II cells as antigen source (*ANA AMA Western Blot*, Bioline diagnostici, Buttigliera Alta, Torino- Italy).. We have analysed with IIF, (data not showed), and the blot methods, fourteen sera of patient with autoimmune disease or that are known for their Aab profile. On statistical analysis we have found a very good agreement on autoantibody determinations for anti Ssa 52 kD, (1.0 of Kendal correlation coefficient, $p < 0.001$), and a significant agreement is also resulted on determinations for anti-CENP-B (0.68 of Kendal correlation coefficient, $p < 0.03$), anti SM B (0.68 of Kendal correlation coefficient, $p < 0.02$) and anti Ssa 60 kD (0.58 of Kendal correlation coefficient, $p < 0.04$). WB failed above all on anti SCL-70 detection (3 cases), IB on anti RNP-70 detection (2 cases). The anti Jo1 was not revealed by IB method in a case of Polimiositis. Our results suggest that use of synthetic or recombinant antigens have improved only anti Scl-70 detection; it is in evidence, moreover, the need of a rigorous standardization of reagent's commercial kits and the analytical laboratory procedures for the detection of Aab in systemic autoimmune diseases.

1. Jaekel H.P., Mueller D., Grobe N. Detectability of Autoantibodies To ENA: Comparative Investigations of Different ELISA KITS, Indirect Immunofluorescence and Immunoblot. *Clin. Lab.* 1998; 44, 673

2. Bizzarro N., Tozzoli R., Tonutti E., Piazza A., Manoni F., Ghirardello A., Bassetti D., Villalta D., Pradella M., Rizzotti P. Variability between methods to determinme ANA, anti ds-DNA and anti ENA autantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J. Immunol. Methods.* 1998; 219, 99

PREVALENZA DELLA GC-GLOBULIN ALLA ELETTOFORESI PROTEICA NEI PAZIENTI CON SINDROME CORONARICA ACUTA

Muratore M.T., Pontillo D., Mongiardo B., Ciapini A., Carozza R., Scabbia E.V.

Laboratorio Analisi, Cardiologia. Ospedale Belcolle, Viterbo.

Nella routine elettroforetica del nostro laboratorio giungono spesso campioni di pazienti (p) con danno vascolare e in terapia eparinica che presentano la migrazione anomala di una banda in zona $\alpha 1$ - $\alpha 2$. Questa banda si è poi rivelata essere Gc-globulin (GcG).

SCOPO: il ruolo della GcG e del sistema scavenger dell'actina non è stato completamente esplorato nei p con sindrome coronarica acuta (SCA). Questo sistema rappresenta un meccanismo biologico importante nella modulazione della trombosi intravascolare: la GcG intrappola la G-actina che si libera dalla lisi cellulare, ne impedisce la polimerizzazione ed i danni conseguenti.

METODOLOGIA: abbiamo studiato 45 p (26 m, 19 f; età media 65 ± 11 anni) ricoverati nella divisione di Cardiologia: 30 p erano affetti da SCA (19 angina instabile, 11 infarto miocardico acuto) e 15 avevano un disturbo del ritmo. A tutti i p è stata eseguita all'ingresso elettroforesi proteica su gel di agarosio. Per identificare la GcG è stata eseguita immunofissazione con antisiero specifico. Per valutare la relazione con l'eparina i campioni (100 μ L) sono stati incubati con protamina cloridrato (20 μ L) per 30' e sottoposti a elettroforesi.

RISULTATI: la GcG era presente in 18 p con ACS e assente in 12 (60% vs 40%). Nei p senza ACS, solo 2/15 erano positivi per GcG, mentre 13 erano negativi (13% vs 87%; $p=0.004$). Nei p con terapia eparinica (23 p) 16 mostravano GcG e 7 erano negativi ($p=0.06$). Nei p senza terapia eparinica (7 p con SCA e 15 con disturbo del ritmo) solo 4 erano positivi per la GcG e 18 negativi ($p=0.003$). L'incubazione con protamina determinava la scomparsa della banda elettroforetica, suggerendo che quest'ultima fosse costituita da GcG associata ad eparina.

CONCLUSIONI: La GcG è un reattante negativo della fase acuta, presumibilmente per un fenomeno di consumo a causa del suo legame con l'actina. La sua produzione è però indotta da alcuni mediatori chimici dell'infiammazione spiegando così gli aumentati valori in corso di danno vascolare e di politraumi (1). I nostri dati dimostrano una discreta prevalenza della GcG nelle SCA, ma non sono sufficienti per poterne valutare il suo andamento temporale e il suo valore prognostico.

BIBLIOGRAFIA:

1. Dahl B, Schiodt FV, Nielsen M, Kiaer T, Williams JG, Ott P. Admission levels of Gc-globulin predicts outcome after multiple trauma. *Injury* 1999; 30(4): 275-281.

INDICATORI BIOUMORALI DI DANNO MIOCARDICO E DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEI PAZIENTI CON ANGINA INSTABILE

Di Serio F.^o, Trerotoli P.*, Pansini N.^o, Marsico S.^o, Colecchia M.^o, Zanna D.§, Brunetti N.§, Serio G.*

^oU.O. Patologia Clinica I, Az. Osp. Policlinico; *DIMIMP, Cattedra di Statistica Medica, Università degli Studi di Bari; § UTIC, Cardiologia Universitaria, Università degli Studi di Bari.

Introduzione. Il presente contributo ha lo scopo di individuare il ruolo degli indicatori di necrosi miocardica (Infarto Acuto del Miocardio: IMA) nella valutazione clinica del danno miocardico in pazienti con angina instabile (AI). **Materiali e metodi.** Sono stati reclutati dall'Unità di Terapia Intensiva Cardiologia (UTIC) dell'Azienda Ospedaliera Policlinico, 61 pazienti che al momento del ricovero presentavano dolore toracico, in 27 è stato diagnosticato IMA, secondo i criteri WHO, nei restanti 34 la diagnosi è stata di AI. In tutti i pazienti al momento dell'ammissione sono stati eseguiti i seguenti dosaggi: mioglobina, MB-massa, troponina-I (cTnI), misurati con metodo immunoenzimatico, proteina C reattiva ultrasensibile (PCR), misurata con metodica immunologia turbidimetrica con amplificazione, omocisteina (HCY), misurata con metodica FPIA. Gli stessi dosaggi sono stati eseguiti su un gruppo di controllo costituito da 81 soggetti esenti da patologia cardiovascolare. E' stata effettuata una analisi statistica descrittiva univariata per ciascuno dei parametri misurati. Il confronto tra gruppi e il legame tra variabili sono stati studiati con metodi non parametrici, in quanto i dati non seguivano una distribuzione gaussiana.

Risultati. I risultati sono sintetizzati nella tabella.

| | MEDIANA | | | Valori di p | |
|----------|---------|-------|-----------|-------------|--------------|
| | AI | IMA | Controlli | AI vs IMA | AI vs contr. |
| Miogl. | 62,5 | 90 | 33 | 0,05 | 0,01 |
| MB-massa | 1 | 26,2 | 0,4 | 0,01 | 0,08 |
| cTnI | 0,15 | 16,67 | 0 | 0,01 | 0,01 |
| PCR | 0,45 | 1,09 | 0,2 | 0,01 | 0,01 |
| HCY | 11,2 | 9,38 | 9,7 | 0,7 | 0,06 |

L'analisi della correlazione ha mostrato nei pazienti con AI, una associazione significativa tra cTnI e MB-massa ($R_s=0,49$; $p<0,05$). I valori degli altri parametri in studio non sono risultati significativamente associati nel gruppo degli AI.

Conclusioni. In accordo con i dati riportati in letteratura i nostri risultati suggeriscono che il dosaggio seriato della cTnI potrebbe essere utile per la valutazione del rischio di danno miocardico nel paziente con angina instabile. Informazioni utili potrebbero derivare dal dosaggio contestuale della PCR. I valori di MB-massa negli AI risulta più simile a quello dei controlli, pertanto potrebbe essere meno indicato per valutare il danno minimo. Appare poco chiaro il ruolo della HCY nella definizione dell'entità del danno cardiaco. Queste rilevazioni sono un'analisi preliminare al fine di individuare i migliori marcatori di danno miocardico e i relativi livelli decisionali.

LA GESTIONE DEL PAZIENTE CON DOLORE TORACICO: TRE RACCOMANDAZIONI SCIENTIFICHE A CONFRONTO

Mion M.¹, Zaninotto M.¹, Altinier S.¹, Cappelletti A.¹, Cacciavillani L.², Plebani M.¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, ²Unità Cardiaca di Terapia Intensiva, Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova

In questo studio, usando la TnI come marcatore di danno miocardico, abbiamo valutato l'efficacia di diversi criteri per la gestione del paziente con sindrome coronarica acuta (ACS) recentemente descritti in tre linee guida: IFCC, NACB, ESC/ACC.

Le misure sono state condotte col metodo TnI Vitros ECI (Ortho-Clinical Diagnostics), le cui prestazioni analitiche sono state esaminate prima della valutazione clinica (tutte le concentrazioni di TnI sono espresse in $\mu\text{g/L}$): imprecisione: (quattro pool con concentrazione media: 0,302-15,217) $\text{CV}\%=3,25-8,8\%$; sensibilità analitica: 0,003; sensibilità funzionale: 0,03; intervallo di normalità: (soggetti sani: 50 maschi+56 femmine, 22-62 anni) 97,5th percentile=0,023, 99th percentile=0,061.

Le curve ROC sono state costruite su campioni seriali (siero) di 11 pazienti con angina instabile (UA) (n=40) e di 9 pazienti con infarto miocardico acuto non Q (AMI) (n=58) ricoverati nell'unità cardiaca di terapia intensiva entro 24 ore dall'episodio di dolore toracico (intervallo di tempo: 4-22 h).

L'analisi delle curve ROC evidenzia:

- ❖ Sensibilità 0,68 e specificità 0,97 per la diagnosi di "danno miocardico minore" (soggetti sani vs UA) ad una concentrazione di TnI di 0,023 (NACB e IFCC).
- ❖ Sensibilità 1 e specificità 0,91 per la diagnosi di AMI (AMI vs UA+soggetti sani) ad una concentrazione di TnI di 0,201; specificità 1 e sensibilità 0,91 ad una concentrazione di TnI di 3,68 (IFCC).
- ❖ Sensibilità 0,97 e specificità 0,95 (AMI vs UA+soggetti sani) ad una concentrazione di TnI corrispondente al 2,5th percentile della distribuzione di valori di TnI nei pazienti con AMI (1,456) (NACB).
- ❖ Sensibilità 0,82 e specificità 0,99 (soggetti sani vs AMI+UA) ad una concentrazione di TnI corrispondente al 99th percentile della distribuzione di valori dei soggetti sani (ESC/ACC).

Il criterio del 97,5th percentile consente di riconoscere i pazienti con UA con un'alta specificità, ma non può essere adottato considerando l'alta imprecisione del metodo a questi valori di concentrazione. Inoltre le strategie dei due cut off non sono in accordo con la corrente definizione clinica di ACS come un continuum patofisiologico. La strategia che sembra superare entrambe queste limitazioni, fornendo la migliore combinazione di sensibilità e specificità, è l'adozione del 99th percentile della distribuzione di valori di soggetti sani come indice di necrosi miocardica.

VITROS E OPUS: DUE SISTEMI A CONFRONTO
NEL DOSAGGIO DEL CK-MB

Tucci E., Santoro R., Angelini G., Verna C., Ricci E., Nubile G.

ASL Chieti Laboratori Analisi
ASL Pescara Laboratorio Analisi Popoli

Nel nostro Laboratorio sono in uso due sistemi per il dosaggio del CK-MB, il primo utilizza l'Opus della ditta Dade-Behring, il secondo il Vitros 250 della ditta Ortho-Diagnostic. Mentre nel primo sistema, che dosa il CK-MB come concentrazione di massa, il principio di rilevazione è basato su metodo ELISA-Sandwich fluorogenico (con "moduli test" autosufficienti all'intera reazione immunologica), nel secondo sistema, che dosa il CK-MB come attività enzimatica, il principio di rivelazione è basato sulla tecnica della "chimica secca" (con lastre multistrato coattate con elementi analitici enzimatici adesi a supporti di poliestere). Il nostro lavoro ha voluto verificare la correlazione (1) dei due sistemi in 10 soggetti con IMA e 45 soggetti con sospetto IMA. Nella tabella 1 sono riportati i valori medi e le DS dei due gruppi. L'analisi statistica di correlazione ha evidenziato una $R=0.93$ nel gruppo IMA ed una $R=0.78$ nel gruppo non IMA, ed in entrambi i gruppi la significatività del test è risultata inferiore a 0.05. E' comunque da segnalare che un unico caso, in cui la CK-MB attività è risultata elevata e il CK-MB massa e' risultato normale, non è stato incluso in nessuno dei due gruppi, trattandosi di un politraumatizzato. In conclusione dall'analisi dei risultati si può affermare che si ottiene una migliore correlazione con valori elevati di CK-MB e quindi nei casi accertati di IMA.

| | CK-MB massa | CK-MB attività |
|-----------|----------------|-------------------|
| IMA | | |
| N | 10 | 10 |
| X medio | 32.4 | 45.5 |
| DS | 25.7 | 27.3 |
| Sosp. IMA | | |
| N | 45 | 45 |
| X medio | 1.62 | 4.46 |
| DS | 1.44 | 3.0 |

CK-MB massa I.R. 0-5 ng/mL

CK-MB attività I.R. 1-16 UI/L

1) Eisenberg PR., Shaw D., Schaab C., Jaffe AS.
Concordance of creatinine kinase MB activity and mass.
Clin. Chem. 1989; 35: 410-443

UTILITÀ DEL BNP NEL MONITORAGGIO
CARDIACO DOPO CHIUSURA DI FISTOLA
ARTERO-VENOSA IN NEFROPATICI

Balduini A.*,Vadacca F.*, Niutta E.#, Maglianico G.#,
Moratti R.*,Merlini G.*,Melzi d'Eril G.V.°

*Laboratorio Analisi Chim.Clin. e Lab. Biotecnol., IRCCS
Policlinico S. Matteo, Pavia, Dip. Biochim. Univ: Pavia;
#Div. Nefrologia, Ospedale Circolo Varese; °Dip. SBSC,
Univ. Insubria, Varese

Il "B-type natriuretic peptide" (BNP) è un ormone secreto dai ventricoli cardiaci in risposta al sovraccarico di pressione e di volume. I pazienti in emodialisi cronica con fistola artero-venosa (FAV) presentano un sovraccarico cronico di volume ad alta gettata. Dopo il primo anno dal trapianto di rene i pazienti sono solitamente sottoposti alla chiusura chirurgica della fistola. Questo è seguito dalla normalizzazione della gittata cardiaca e da una progressiva riduzione della massa del ventricolo sinistro nei successivi 6-9 mesi.

I livelli di BNP sono stati determinati in 11 pazienti in emodialisi cronica portatori di FAV e successivamente trapiantati di rene. In cinque di questi la FAV è stata chiusa. I livelli di BNP sono stati determinati sul plasma (EDTA) utilizzando il metodo Triage BNP (Biosite Diagnostic) adottando come intervallo di riferimento 5-40 pg/mL. I livelli di BNP sono stati determinati su campioni prelevati immediatamente prima della chiusura della FAV (tempo 0) e 6 mesi dalla chiusura della stessa (gruppo A) e in un periodo equivalente nei 6 pazienti nei quali la FAV è stata mantenuta aperta (gruppo B). I valori di BNP in pg/mL sono riportati inTabella.

| Gruppo A (FAV chiusa) | | Gruppo B (FAV aperta) | |
|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| Tempo 0 | 6 mesi | Tempo 0 | 6 mesi |
| 302 | 116 | 95 | 102 |
| 75 | 53 | 18 | 24 |
| 58 | 47 | 104 | 139 |
| 48 | 11 | 33 | 104 |
| 62 | 135 | 19 | 166 |
| | | 14 | 19 |

In quattro dei cinque pazienti del gruppo A, nei quali la FAV è stata chiusa, si è osservata riduzione dei livelli di BNP. Il paziente nel quale il BNP è aumentato da 62 a 135 pg/mL era affetto da stenosi aortica. In contrasto, in tutti i pazienti del gruppo B si è assistito ad incremento dei livelli di BNP, in qualche caso considerevole.

I risultati di questo studio preliminare confermano che il BNP è un utile marcatore di sovraccarico cardiaco in pazienti in emodialisi con FAV e indicano una sua utilità nel monitoraggio del recupero delle normali condizioni cardiache dopo la chiusura della FAV.

INFLUENCE OF MTHFR C677T AND A1298C GENE POLYMORPHISMS ON TOTAL HOMOCYSTEINE IN STABLE RENAL TRANSPLANT PATIENTS

Mura A.¹, Perino M.G.¹, Simula M.P.¹, Carru C.¹, Deiana L.¹, Sorba G.², Cossu M.², Pinna G.G.³, Pes G.M.¹

¹Chair of Clinical Biochemistry; University of Sassari viale S. Pietro 43/ b -07100 SASSARI-Italy; ²Division of Nephrology and Renal Transplant, Civil Hospital, Sassari; ³Dept. Biomedical Sciences, University of Sassari

Increased levels of plasma homocysteine (Hcys) are common in stable renal transplant patients (RTP) and are considered a risk factor for athero-thrombosis in these subjects. Among the factors responsible for the Hcys elevation in RTPs there is a reduced activity of the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), due to the presence of genetic variants such as C677T and A1298C polymorphisms. In this study, the effect of both these variants on plasma Hcys was evaluated in 108 stable RTPs (56 men, 52 women, mean age 46.3 ± 11.9) followed at the Division of Nephrology and Renal Transplant of Sassari, as well as in 93 controls subjects. Plasma Hcys concentration was measured by HPLC. The MTHFR C677T and A1298C polymorphisms were determined by PCR amplification and restriction analysis with *HinfI* and *MboII*, respectively. The effect of the MTHFR 677/1298 genotypes was evaluated by univariate correlation and multiple regression analysis. Plasma Hcys was slightly elevated in RTPs (11.4 ± 8.2) compared to controls (8.9 ± 5.4) although this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The carriers of 677TT genotype had significantly higher Hcys levels ($12.6 \pm 7.7 \mu\text{mol/L}$) than those with 677CC (7.3 ± 6.8 ; $p < 0.05$) but not with 677CT genotype ($10.5 \pm 8.6 \mu\text{mol/L}$). When adjusted for glomerular filtration rate, Hcys did not show significant differences among all genotypes. Hcys levels did not vary according the A1298C genotypes. Only plasma creatinine showed a significant correlation with Hcys in RTPs ($r = 0.22$; $p < 0.01$). Conclusions: MTHFR 677TT genotype has an increasing effect on Hcys levels in RTPs. The other 677 genotypes as well as the A1298C polymorphism do not show any influence on Hcys. The only strong determinant of plasma Hcys in RTPs is glomerular filtration rate.

STABILITÀ DEL BNP NEL CAMPIONE DI SANGUE INTERO E NEL PLASMA CONGELATO

Maschio S.^o, Vettorato L.^o, Piaserico G.^o, Giomo A.^o, Buchberger R.*

^oLaboratorio Analisi Chimico-Cliniche, * U.O. Cardiologia A.U.L.S.S.8 - P. O. Montebelluna, Via M. Grappa 32, 31044 Montebelluna (TV)

SCOPI ED OBIETTIVI

L'ormone natriuretico, identificato negli anni '80, comprende almeno 3 peptidi secreti dal cuore (ANP, BNP, CNP). Tra i peptidi natriuretici cardiaci il BNP, prodotto dai ventricoli, sembra il più utile clinicamente, correlando meglio con la gravità dell'insufficienza cardiaca e con le 4 classi funzionali della classificazione NYHA. Il BNP potrebbe risultare utile per selezionare i pazienti che necessitano di approfondimenti diagnostici più costosi e/o invasivi, quando utilizzato come test di 1° livello nell'ambulatorio cardiologico e di P.S.. La disponibilità, oggi, di un test immunofluorimetrico rapido e semplice, rispetto ai complessi metodi di dosaggio RIA ed IRMA, ci ha spinto a valutare le potenzialità diagnostiche del BNP.

METODOLOGIA E RISULTATI

Per la determinazione del BNP è stato utilizzato il kit Triage BNP (Biosite Diagnostics). In 15 pazienti con diversi valori di BNP abbiamo confrontato il dato ottenuto su sangue intero (raccolto in EDTA ed analizzato entro un'ora dal prelievo) con il valore ottenuto su plasma (congelato a -20° senza inibitore delle proteasi plasmatiche e analizzato entro 30 gg dal prelievo) non osservando variazioni significative. In 5 pazienti sono stati fatti 4 prelievi (il primo basale e poi 10', 60' e 180' dopo test da sforzo) per verificare l'eventuale influenza dell'attività fisica e della permanenza del campione a temperatura ambiente (4 ore dal prelievo): anche in questo caso non si sono osservate variazioni significative.

CONCLUSIONI

Dalla nostra esperienza ci sembra di poter concludere che: 1) il prelievo per il dosaggio del BNP non richiede attenzioni particolari (come riposo e clinostatismo); 2) l'analisi può essere eseguita sia su sangue intero che su plasma congelato; 3) l'aggiunta di inibitori delle proteasi aspecifiche (aprotinina) al campione da congelare non è essenziale per la stabilità del BNP, per periodi di conservazione inferiori al mese. Nel campione fresco con EDTA, il BNP ha un'emivita più lunga di quanto ipotizzato in passato ed i valori sono stabili, a temperatura ambiente, per almeno 4 ore. Questa stabilità, unita alla semplicità d'uso, rendono il dosaggio del BNP una metodica di facile esecuzione, adatta ad un uso routinario per la valutazione dell'insufficienza cardiaca.

BIBLIOGRAFIA

A. Gobinet-Georges, N. Valli, H. Filliatre, M. Dubernet, O. Dedeystere and L. Bordenave. *Clim. Chem. Lab. Med.* 2000; 38(6):519-523.

CONFRONTO TRA DUE METODI DI DOSAGGIO PER LA CROMOGRANINA A (CgA) NEI TUMORI NEUROENDOCRINI (NE)

Ferrari L., Seregni E., Mariani L., Miceli R., Martinetti A., Ballabio G., Bajetta E., Luksch R., Bombardieri E.

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

Scopi/obiettivi. Il valore clinico di un marcatore tumorale dipende dalle sue caratteristiche biologiche e dalle prestazioni analitiche del saggio utilizzato per dosarlo. Questo è soprattutto vero per la CgA, il marcatore circolante più accurato per la diagnosi di tumore NE. Questa proteina, infatti, viene sottoposta ad idrolisi specifica ed origina una serie di frammenti aventi differenti proprietà immunologiche. Nel nostro studio è stata effettuata una valutazione comparativa dell'accuratezza clinica della misurazione della CgA con due differenti saggi in pazienti (pz.) con tumori NE.

Metodologia. La CgA è stata misurata sia con un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) fornito dalla DAKO AS che con un immunoradiometric assay (IRMA) fornito dalla CIS Diagnostici. Le misurazioni sono state eseguite su 91 pz. (14 senza evidenza di malattia, 12 con malattia loco-regionale e 65 con malattia metastatica avanzata). Gli istotipi erano i seguenti: 46 carcinoidi, 17 tumori insulari del pancreas, 12 neuroblastomi (NB), 5 paragangliomi, 4 carcinomi midollari della tiroide, 3 carcinomi a cellule di Merkel, 2 ganglionB e 2 microcitomi polmonari. L'accuratezza clinica dei due saggi è stata valutata effettuando una receiver operating curve (ROC) analysis. La correlazione esistente tra le misure effettuate con i due metodi di saggio è stata valutata tramite l'analisi lineare standard (approccio di tipo parametrico) e la correlazione secondo Passing-Bablok (approccio di tipo non parametrico).

Risultati. La ROC analysis (eseguita su 182 misurazioni) ha dimostrato che per il saggio ELISA l'area sotto la curva è 0.90, mentre quella relativa al saggio IRMA è 0.87, con una differenza di 0.03 (intervallo di confidenza al 95%: -0.02, 0.09). I livelli di cut-off scelti sono stati di 34 U/L per il saggio ELISA e di 100 ng/mL per il saggio IRMA. Prefissando la specificità al 100% per ambedue le metodiche di dosaggio, la sensibilità del saggio ELISA è risultata del 76% e quella del metodo IRMA del 64%. L'analisi di correlazione (eseguita su 150 campioni) ha fornito i seguenti risultati.

| <u>Tipo di correlazione</u> | <u>Equazione della retta</u> |
|-----------------------------|---|
| Lineare standard | $Y_{(ELISA)} = 1.42X_{(IRMA)} - 114.84$ $r = 0.61$ |
| Passing-Bablok | $Y_{(ELISA)} = 0.68X_{(IRMA)} - 26.19$ |

Considerazioni conclusive. L'analisi di correlazione ha dimostrato che i sistemi immunologici di cattura e rilevazione dell'analita utilizzati dai due saggi non sono equivalenti. Tuttavia la ROC analysis dimostra che il valore clinico della misurazione non sembra essere influenzato in modo drastico dal metodo di misura.

C-erb-B2 E CA 15.3 COME PREDITTORI DI SOPRAVVIVENZA IN PAZIENTI CON CARCINOMA MAMMARIO AVANZATO

Martinetti A., Seregni E., Mariani L., Ferrari L., Miceli R., Bajetta E., Zilembo N., Pozzi P., Bombardieri E.

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

Scopi/obiettivi. L'overespressione dell'oncogene c-erb-B2 rappresenta un fattore prognostico negativo per il carcinoma della mammella. Il dominio extracellulare di c-erb-B2 può essere dosato nel siero. La nostra è un'analisi retrospettiva su pazienti (pz.) postmeno-pausali con carcinoma mammario avanzato in trattamento con differenti terapie ormonali (anti-estrogeni ed inibitori dell'aromatasi) per verificare l'associazione del c-erb-B2 sierico con il marcatore tumorale CA 15.3 e con altre caratteristiche sia delle pz. che della malattia.

Metodologia. I livelli sierici di c-erb-B2 sono stati misurati con un saggio immuno-enzimatico della INALCO ed il CA 15.3 è stato dosato con un saggio immunoradiometrico della Medical System.

Risultati. Sono stati effettuati prelievi basali e durante il trattamento a 265 pazienti, il 78% ed il 55% erano positive per i recettori estrogenici e progestinici, il 59% aveva i linfonodi regionali metastatici, il 61% aveva fatto una terapia adiuvante, il 75% aveva un intervallo libero da malattia >2 anni ed il 48% aveva sedi multiple di malattia. Il follow-up mediano è stato di 47 mesi. Il c-erb-B2 è risultato significativamente associato a: stato linfonodale ($p=0.0048$), terapia adiuvate ($p=0.023$), CA 15.3 ($p=0.0001$). Inoltre, i livelli di c-erb-B2 sono significativamente associati al progression free survival (PFS) ed alla risposta obiettiva (RO). Come si evince dalle stime di rischio relativo, livelli elevati di c-erb-B2 sono risultati tendenzialmente associati a una prognosi sfavorevole. Il CA 15.3 è significativamente associato a RO, PFS ed overall survival (OS). Lo studio delle interazioni ha evidenziato una significatività statistica dell'interazione tra c-erb-B2 e disease free interval (su RO ed OS) e CA 15.3 (su OS). Inoltre, si è evidenziato come l'effetto prognostico sfavorevole associato a livelli elevati di c-erb-B2 tende ad attenuarsi al crescere dei livelli di CA 15.3. Il valore di c-erb-B2 rilevato durante il trattamento è risultato fortemente associato al relativo valore basale ($p=0.0001$). La mediana dei valori misurati durante il trattamento è significativamente maggiore di quella dei valori basali (187 fm/mL vs. 179 fm/mL. Per quanto riguarda l'effetto prognostico della variazione di c-erb-B2, sono stati ottenuti risultati significativi per il PFS ($p=0.006$) e l'OS ($p=0.0400$), mentre nessun effetto prognostico significativo è emerso sulla RO. *Considerazioni conclusive.* I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che elevati livelli sierici di c-erb-B2 e di CA 15.3 possono essere degli utili indicatori prognostici per la RO e per l'OS.

VALUTAZIONE DEI MARCATORI DI METABOLISMO OSSEO IN PAZIENTI CON METASTASI OSSE IN TERAPIA CON AREDIA®

Martinetti A., Seregini E., Ferrari L., De Conno F., Ripamonti C., Groff L., Ballabio G., Bombardieri E.

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

Scopo dello studio. In questo studio abbiamo verificato se gli indicatori biochimici di rimodellamento osseo possono fornire utili informazioni sull'efficacia clinica del trattamento con Pamidronato (Aredia®) in pazienti con metastasi ossee. *Pazienti e metodi.* Lo studio è stato condotto su 42 pazienti (35 femmine; 7 maschi), età mediana 61 anni range (33-78). Tutti i pz erano portatori di metastasi ossee da vari tipi di tumore primitivo. I pazienti sono stati trattati con 60 mg di Pamidronato in 500 cc di fisiologica in infusione per 2 ore secondo il seguente schema: 3 infusioni in 15 giorni seguite da un intervallo intervallo di 21 giorni (1° ciclo), ulteriori 3 infusioni in 15 giorni seguite da un intervallo di 21 giorni (2° ciclo) e per i cicli successivi 1 infusione ogni 21 giorni. Tutti i pz hanno ricevuto un adeguato trattamento analgesico. Durante i primi 2 cicli di trattamento sono stati effettuati settimanalmente dei prelievi ematici e la raccolta di campioni urinari (seconda minzione del mattino). Sono stati valutati tre indicatori sierici di formazione ossea; il frammento N-terminale del procollagene di tipo I (PICP), L'osteocalcina (OC), e la fosfatasi alcalina isoenzima osso (B-ALP). Come indicatori di riassorbimento osseo sono stati valutati un indicatore sierico, il telopeptide C-terminale del collagene di tipo I (ICTP); e due indicatori urinari, le deossipiridinoline (D-PYR) ed il telopeptide N-terminale del collagene di tipo I con legame piridinolinico (NTx). *Risultati.* Per l'analisi dei risultati i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base all'utilizzo di analgesici durante il trattamento con Pamidronato. 12 pazienti hanno ridotto il consumo di analgesici (1), 18 pazienti hanno mantenuto lo stesso dosaggio (2) mentre 12 pazienti hanno aumentato il dosaggio o il tipo di analgesico utilizzato (3). In tabella sono riportate le percentuali medie rispetto al valore basale degli indicatori valutati, nei tre gruppi di utilizzo di analgesici alla fine del 1° e del 2° ciclo di terapia.

| ciclo | PINP µg/L | | | OC ng/ml | | | B-ALP U/L | | |
|-------|-----------|-----|-----|-------------|----|-----|-----------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1° | 78 | 72 | 86 | 120 | 72 | 86 | 89 | 84 | 75 |
| 2° | 62 | 63 | 64 | 91 | 63 | 64 | 79 | 64 | 75 |
| ciclo | ICTP µg/L | | | D-PYR nM/mM | | | NTx nM/mM | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1° | 95 | 108 | 135 | 68 | 73 | 111 | 28 | 40 | 50 |
| 2° | 92 | 118 | 141 | 78 | 89 | 123 | 42 | 42 | 65 |

Conclusioni. Dai risultati di questo studio emerge che l'andamento dei livelli di ICTP, NTx e D-PYR sembrano predire la capacità del trattamento di controllare il dolore e di ridurre l'utilizzo di analgesici.

RAPPORTO COSTO/EFFICACIA DI MODELLI PREDITTIVI DELLA PROGNOSE DI MALATTIA IN PAZIENTI AFFETTI DA NEUROBLASTOMA LOCALIZZATO

Marchese N.¹, Canini S.¹, Armanino C.², Conte M.³

1 Laboratorio centrale di Analisi Chimico-Cliniche
3 IV Divisione di Pediatria-IRCCS "G.Gaslini"

Largo G.Gaslini,5 - Genova

2 Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari-Università degli Studi - Genova

Il Neuroblastoma (NB) è il più comune tumore solido dell'età pediatrica ed è caratterizzato da un'elevata escrezione di catecolamine. Circa il 30 % dei pazienti con diagnosi di NB presenta un tumore primario chirurgicamente asportabile e nessuna metastasi: questo tipo di neoplasia è classificato come NB Localizzato. La prognosi è molto favorevole, solo una percentuale ridotta di questi pazienti mostra recidive fatali. Rimangono tuttavia tutt'ora irrisolti numerosi problemi relativi alla prognosi e alla relativa ottimizzazione delle terapie. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il peso di ciascun marcatore biochimico come predittore della ricaduta o della guarigione di pazienti con NB localizzato e i relativi costi. Abbiamo analizzato alla diagnosi (anni 1990-95) mediante tecniche cromatografiche (GC, HPLC) le urine e il plasma di 65 pazienti (età mediana 14 mesi). Dopo 5 anni di follow-up 46 pazienti erano in remissione completa, 14 in ricaduta e 5 pazienti erano deceduti. Sono stati determinati i seguenti parametri: acido vanilmandelico urinario e plasmatico, acido omovanillico urinario e plasmatico, enolasi neuronospecifica, lattatodeidrogenasi e ferritina su sangue, catecolamine su urine (norepinefrina, epinefrina, dopamina, normetanefrina, metanefrina e 3-metossitiramina). Mediante modelli di analisi discriminante lineare (software Parvus e SPSS per Windows) e tenendo in considerazione solo due classi statisticamente significative (remissione e recidiva), è stato possibile costruire due modelli di predizione dell'esito di malattia: il primo utilizza solo 5 parametri biochimici, il secondo 9 marcatori più l'età del paziente alla diagnosi. Sono stati calcolati i costi dei singoli analiti tenendo conto delle spese dei reagenti, materiali di consumo e del 20 % relativo a spese generali. Il I modello è risultato essere meno costoso (£.81000 per paziente), ma meno efficace per pazienti con esito sfavorevole (35,7 % di corretta classificazione). Il II modello è apparso più costoso (£.130000 per persona), ma più efficace per i pazienti in ricaduta (71,4 % di corretta classificazione). La previsione della prognosi è stata invece simile nei due modelli in caso di remissione (97,8% contro 95,6%). Sull'intera popolazione l'efficienza del I modello è dell'83 % e quella del II è del 90 %. In conclusione, nel caso di utilizzo del II modello, a fronte di un maggiore costo di £.49000 per paziente, si ha una maggiore efficienza del 7 %. Berthold F. et al. Am.J.Pediatr.Oncol. 1994 ; 16(2):107-15.

IS 90K/MAC-2BP A NEW SEROLOGICAL TUMOR MARKER USEFUL FOR THE DIAGNOSIS OF HCC DEVELOPMENT?

Iacovazzi P.A.*, Barletta D.*, Iacobacci A., De Michele G.*, Elba S.°, Manghisi O.G.°, Correale M.*

*U.O. Laboratorio di Patologia Clinica ed °U.O. Medicina Gastroenterologica, I.R.C.C.S. "S. De Bellis" Castellana Grotte (BA)

90K/Mac-2BP glycoprotein is part of the scavenger receptor cysteine rich protein superfamily, whose members are involved in several immunologic mechanism. Furthermore, 90k was found in the serum of healthy individuals and, at higher levels, in patients with some immuno-disorders (i.e. HIV, Henoch-Schoenlein purpura, Jurkat lymphoma), various types of cancer (i.e. breast, ovarian) or in course of viral infections inducing immuno-compromision (i.e. HIV, HCV).

Because HCV infection could often induce chronic liver disease with an high risk to develop cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma (HCC), a lot of serological tests were assayed to follow the natural history and clinical features of the progression of this infection.

The aim of this study was to evaluate 90K levels in the serum of patients with HCV-related cirrhosis or HCC and compared them with those of AFP, which is the reference marker for HCC.

Ninety-three patients with cirrhosis (58 anti-HCV+ and 35 anti-HCV-) and sixty patients with HCC (50 anti-HCV+ and 10 anti-HCV-) were included.

Mac-2BP was measured by an ELISA method (DIESSE, Italy), using the same monoclonal antibody as catcher and tracer, and AFP by an automated chemiluminescent assay (DPC system, USA).

90K serum levels (cut-off 14µg/ml) were found elevated both in cirrhosis (39%) and HCC (46%) in contrast with AFP which was found over the cut-off of 20ng/ml in the 14% and 45% of the same patients.

There was a significant association with the presence of anti-HCV antibodies in cirrhotic (p=0.0001, Student's test) and HCC patients (p=0.001, Student's test). When the positivities of both or either AFP and Mac-2BP were considered, it was noteworthy that 74% of HCC patients showed at least a positive marker.

According with these results and considering a probable different biological significance of 90K from AFP, we suggest that their combined use could improve the sensitivity of one single test in the diagnosis of HCC.

Reference

Correale M, Giannuzzi V, Iacovazzi PA et al. Serum 90K/Mac-2BP glycoprotein levels in hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Anticancer Res* 1999; 19: 3469-72.

IMPORTANZA DELL'ESAME URINE NELL'IDONEITÀ SPORTIVA: CASE REPORT

Flacco L.*, Calvarese M.*, Faricelli R.***, D'Amico V.***, Bucci E.***, Rabottini S.***, G. Nubile**

*Medicina dello Sport; **Laboratorio di Patologia Clinica, ASL Chieti-Ortona

L'esame delle urine rappresenta l'unica indagine ematochimica obbligatoria per legge nell'ambito della visita di idoneità sportiva: esso costituisce mezzo semplice, non invasivo e relativamente poco costoso per l'individuazione di patologie anche gravi che potrebbero slatentizzarsi, evolvere o aggravarsi in seguito ad esercizio fisico. I parametri rilevati con l'esame chimico-fisico delle urine sono fortemente orientativi per problematiche infettive (pH), dismetaboliche (glucosio e corpi chetonici), epatobiliari (bilirubina ed urobilinogeno) e renali, primitive e secondarie a patologie sistemiche (emoglobina, proteine, peso specifico). Importanti indicazioni sono fornite anche dall'esame microscopico del sedimento, in particolare con l'individuazione e la caratterizzazione di flora batterica, emazie etc. Parallelamente al ruolo di prevenzione esercitato dalla Medicina dello Sport, l'esame urine ha spesso consentito di smascherare patologie silenti, come evidenziato da un'ampia letteratura. CASE REPORT: F.E., maschio, 9 anni, giunge alla nostra osservazione nel corso dell'anno 2000 per conseguimento di idoneità sportiva agonistica alla pratica del judo. Il soggetto presenta: anamnesi familiare e fisiologica nella norma; anamnesi patologica prossima positiva per le C.M.E. ed episodi di otite e tonsillite ricorrenti nella prima infanzia; portatore di lieve valgismo delle ginocchia per cui viene seguito in ambiente specialistico; anamnesi sportiva: pratica judo da alcuni mesi con tre sedute di allenamento settimanali; non riferisce alcun disturbo o sintomatologia a riposo, in corso di allenamento o sforzo fisico. L'esame obiettivo risulta nella norma. Peso corporeo: 31Kg, altezza: 140cm, P.A.: 120/70 mmHg. L'ECG evidenzia una IVS per criteri di voltaggio ed un'anomalia (sopraslivellamento) diffusa del tratto ST. L'esame delle urine rileva un peso specifico pari a 1009 ed un contenuto in proteine pari a 70 mg/dl con normalità degli altri parametri. Viene richiesta la ripetizione dell'esame che evidenzia esiti sovrapponibili, con l'aggiunta di 5-10 eritrociti per campo. Nel sospetto di una insufficienza renale e nell'intento di accelerare l'iter diagnostico, si invia a consulenza nefrologica ove si opta per un regime di ricovero, si riscontra: proteinuria delle 24 ore: 1.1-1.3 gr; creatininemia: 1.67 mg/dl; BUN 32 mg/dl; uricemia: 7 mg/dl. Ecografia renale: reni iperecogeni, scarsa differenziazione cortico-midollare; rene dx: 6.5 cm; rene sx: 8 cm. Si diagnostica: "Insufficienza renale cronica. Ipertensione arteriosa", con consiglio di terapia domiciliare con calcio antagonisti e regime dietetico. Il caso preso in considerazione è un esempio eclatante dell'importanza della Medicina dello Sport in ambito preventivo e della stretta propedeuticità in tal senso delle indagini laboratoristiche e dell'esame urine nella fattispecie. Tale esame infatti ha consentito di sospettare una patologia latente altrimenti misconosciuta e, seguendo l'iter diagnostico opportuno, di arrivare ad una definizione diagnostica e terapeutica.

VALUTAZIONE DI ALCUNI PARAMETRI METABOLICI ED OSSIDATIVI IN ATLETI NEL CORSO DI UNA STAGIONE AGONISTICA

Razzano M.*, Brambilla P.*, Picozzi L.^o, Gironi A.^o, Giani E.*

* Laboratorio Analisi Ospedale "L. Mandic" – Merate

^o CAM Centro Analisi Monza

• CAM Medicina dello Sport – Monza

È ormai noto che l'esercizio fisico continuato ed intenso induce un aumento della produzione di radicali liberi attraverso vari meccanismi.

Lo scopo del nostro studio è stata la valutazione dello stato ossidativo in un gruppo di atleti professionisti in diversi momenti della stagione agonistica.

Nei soggetti prelevati secondo criteri standardizzati, sono stati valutati alcuni parametri relativi al stato ossidativo (radicali liberi, barriera antiossidante totale), al metabolismo lipidico, marziale ed ormonale.

I valori della barriera antiossidante totale sono risultati prima dell'inizio della stagione agonistica statisticamente superiori rispetto ad una popolazione di controllo di soggetti non sportivi comparabili per sesso ed età.

A stagione agonistica inoltrata si è osservato un decremento significativo del valore della barriera antiossidante totale nella maggior parte degli atleti, con un contestuale aumento della carica di radicali liberi.

Si è valutato inoltre, nei campioni biologici presi in esame, l'andamento della concentrazione dei gruppi tiolici e si è cercato di individuare le correlazioni dei parametri del metabolismo ossidativo con altri indici metabolici.

I risultati preliminari inducono a continuare nello studio per poter monitorare i criteri di correlazione tra variazioni dello stato ossidativo ed esercizio fisico intenso e prolungato.

McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T, Sebastianelli W

Effect of resistance exercise on free radical production
Med Sci Sports Exerc 1998 Jan; 30: 67 - 72

Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF

Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status

Clin Sci (Colch) 1999 Apr; 96: 381 - 5

Pincemail J, Lecomte J, Castiau J, Collard E, Vasankari T, Cheramy-Bien J, Limet R, Defraigne J

Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players after 4 months of competition

Free Radic Biol Med 2000 Feb 15; 28: 559 - 65

VARIAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO PRE E POST PRANDIALE IN PAZIENTI DIABETICI

Barletta A. (1), D'Amico M.V. (1), Vincelli M.R. (1), Venditti D. (1), Scutellà M. (1), Palladino A. (1), Sebastiano C. (1), Vitale C. (2), Puntillo A. (2), Bucci M. (1), Tagliaferri M. (2)

(1) Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche; (2) Unità Operativa di Diabetologia - P.O. "G. Vietri" - Via Lualdi, 1 - 86035 Larino (CB)

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare lo stress ossidativo nel paziente diabetico. La nostra indagine è stata effettuata su 43 pazienti di età compresa tra 36 e 88 anni, afferenti all'U.O. di Diabetologia del P.O. "G. Vietri" di Larino (CB). Al fine di valutare la variazione dei livelli plasmatici dei ROMs è stato eseguito un prelievo sia a digiuno che in fase post prandiale (a 90 min). Inoltre per ogni paziente sono stati considerati: l'età, la durata del diabete, il tipo di terapia, la glicemia, la HBA1c, il colesterolo, i trigliceridi, le complicanze e le eventuali patologie associate. In base alla durata del diabete i pazienti sono stati divisi in 3 classi (0-5 anni, 6-15 anni, oltre 15 anni). L'analisi dei ROMs è stata effettuata con il kit Diacron applicato su tecnologia Hitachi mentre per la valutazione della HBA1c è stata utilizzata una metodica HPLC su strumento Merck-Hitachi L9110. Dei 43 soggetti esaminati 30 (70%) hanno mostrato livelli di ROMs, a digiuno, superiori a 340 U.Carr. Si è osservato uno stress ossidativo nel 57% dei pazienti affetti da patologia diabetica da più di 15 anni, nel 58% di quelli con durata da 6-15 anni e nell'81% di quelli con diabete recente. L'iperglicemia è stata rilevata in tutti i pazienti e in 30 di essi (70%) è correlata con livelli elevati di ROMs. La HBA1c è risultata elevata per 36 diabetici e in 27 (75%) è correlata ad un aumento di ROMs. Confrontando i valori di ROMs a digiuno e post prandiali è risultato un aumento della loro produzione solo nel 17% dei casi, mentre nell'83% si è riscontrata una loro riduzione, seppur limitata. Questi dati rivelano che i pazienti diabetici sono soggetti a stress ossidativo associato all'iperglicemia in accordo con i dati presenti in letteratura. La presenza di stress ossidativo in pazienti con diagnosi diabetica recente può essere la conseguenza di un alterato livello glicemico precedente la diagnosi. Livelli di ROMs post-prandiali leggermente ridotti rispetto a quelli osservati a digiuno possono essere giustificati con l'adozione della terapia ipoglicemizzante associata ad un regime dietetico equilibrato.

A. Ceriello. *Oxidative stress and Glycemic Regulation. Metabolism, Vol 49, N 2, Suppl 1 (February), 2000. pp:27-29.*