

DETERMINAZIONE CROMATOGRAFICA DEL MELFALAN

Ujka F., Bonvicini P., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

Viene presentato un metodo in HPLC, specifico e sensibile per la determinazione del Melfalan, un agente alchilante bifunzionale con ampio spettro di attività antitumorale. Una parte di campione va deproteinizzata con due parti di metanolo contenente lo standard interno (n-propyl p-hydroxy-benzoato, 0,5 mg/L). Dopo agitazione e centrifugazione per 5 min a circa 4000 g il surnatante limpido viene utilizzato per l'analisi cromatografica. La separazione migliore è stata ottenuta con una colonna C8 (Genesis) a fase inversa (4,6 mm x 150mm, dimensione delle particelle 4µm) a temperatura ambiente e con rivelazione UV (261nm). La fase mobile che ha dimostrato una migliore selettività è risultata essere una miscela di metanolo: acqua : ac. acetico (50:55:1) con il flusso regolato a 1,0 mL/min per 3 min, poi a 1,5 mL/min e un volume iniettato di 30µL. La pressione risulta di circa 3.0 Mpsi. In queste condizioni i tempi di ritenzione sono di circa 6 min e 12 min rispettivamente per il Melfalan e lo standard interno.

Imprecisione: nella serie CV% di 3,03 alla concentrazione di 2 mg/L, n=10; CV% di 6,45 alla concentrazione di 0,5 mg/L, n=10; tra serie CV%=3,0 alla concentrazione di 2 mg/L, n=5. Ripetibilità per un campione da 2 mg/L CV%=2,14. Sensibilità: limite di rivelabilità 0,06 mg/L; limite di quantificazione 0,125 mg/L. Linearità: fino a 20 mg/L. L'identità del picco nei campioni è stata confermata mediante prove di aggiunta e tramite spettro di assorbimento. Le prove sono state effettuate su campioni di plasma arricchito.

Il metodo è risultato idoneo per l'analisi su campioni di plasma, urina e liquidi di perfusione.

Pinguet F et al. High-performance liquid chromatographic assay for melphalan in human plasma. Application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr. B* 686 (1996) 43-49.

DOSAGGIO CROMATOGRAFICO (HPLC) DELLA BENZOILECGONINA URINARIA

Cangiano G¹, Manera B.¹, Cimmino A.¹, D'Amora M.², Florio M.³, Giardiello D.¹, Vrenna L.¹

ASL NA 1: ¹Dipart. Farm. – Lab. Tossicolog. Riferim. Territoriale; ²Responsab. Area Medicina di Laboratorio. ³Bio-Rad Laboratoires
e-mail: giocangiano@libero.it

La Benzoilecgonina (BE) urinaria, rilevata col sistema cromatografico – HPLC – Remedi-HS della ditta BioRad, evidenzia dei problemi di identificazione a concentrazioni prossime o inferiori a 1000 ng/mL o in presenza di sostanze aventi tempi di ritenzione simili.

Viene pertanto proposto un dosaggio cromatografico effettuato in HPLC con sistema isocratico a fase inversa sullo strumento Chromat 3 della ditta Biorad, con il relativo kit starter per Remedi (fase mobile costituita da una miscela di acetonitrile-metanolo e diluita con acqua nelle proporzioni di 36:65; colonna analitica 2 contenente una fase stazionaria non derivatizzata in silice) ed utilizzando una lunghezza d'onda di 235 nm, temperatura ambiente e flusso di 0,6 ml/min.

La determinazione necessita di 5 mL di urina tamponata a pH 9,0, saturata con cloruro sodico e successivamente trattata con una miscela costituita da cloroformio, isopropanolo ed esano rispettivamente nei rapporti volumetrici di 7:3:100. Alla fase acquosa ottenuta vengono aggiunti 4 mL di cloroformio. Dopo centrifugazione vengono raccolti 2,5 mL di fase organica fatta evaporare sotto vuoto a temperatura di 70-80°C. Il campione da sottoporre all'analisi cromatografica è costituito dal residuo secco ripreso con 1.0 mL di fase mobile del kit starter Remedi-HS.

Con tale procedura vengono rilevati tempi di eluizione della BE tra i 6.7-7.0 minuti.

Nell'intervallo analitico compreso tra 62 e 3000 ng/mL di BE viene evidenziata una buona linearità del metodo ($r = 0,9999$) ed un profilo di imprecisione mostrante un CV% <6%. Le prove di recupero mostrano coefficienti di variazione compresi tra il 101,0 ed il 130,2% (recupero medio del 105,4%). Le prove di precisione nella serie (n=20) e tra le serie (20 giorni lavorativi) mostrano CV% inferiori al 4%. Il metodo proposto non mostra difficoltà nell'estrazione liquida e consente di evitare la più lunga e delicata metilazione a cocaina da far identificare sul sistema Remedi-HS.

Nelson J.W., Binder S.R. A drug profiling system for emergency toxicology. *American Clinical Laboratory* Dec 1989

SIMULTANEA E RAPIDA DETERMINAZIONE IN GC-MS-CI DEGLI ACIDI FITANICO E PRISTANICO NEL PLASMA

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

Laboratorio di Biochimica Metabolica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

La determinazione degli acidi Fitano (Fit) e Pristanico (Pri) nel plasma e del loro rapporto rappresenta un punto chiave per la diagnosi della Malattia di Refsum, dei difetti della biogenesi dei perossisomi ed alcuni difetti isolati perossisomiali.

Abbiamo messo a punto un metodo in gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa a ionizzazione chimica (GC-MS-CI) per la determinazione simultanea di Fit e Pri nel plasma derivatizzati a metilesteri. Il dosaggio di Fit e Pri viene effettuato utilizzando come metodo di acquisizione il Select Ion Monitoring (SIM) degli ioni 327m/z e 313m/z e degli ioni 330m/z e 316m/z corrispondenti ai relativi standard interni tri-deuterati.

Per eliminare le interferenze derivanti dalla presenza nel plasma di acidi grassi insaturi che comunemente co-eluiscono insieme all'acido Fit ed hanno alcuni ioni comuni nella frammentazione, abbiamo modificato il metodo di Lepage e Roy (1) aggiungendo al campione e ai 4 ml di soluzione estraente (metanolo/benzene 4:1) 80 µl di bromo. Per ottenere una separazione ottimale dei picchi di Fit e Pri, in 20 minuti di corsa, abbiamo utilizzato una colonna capillare polare BPX70 (SGE).

Il recupero è stato del 92% e 95% con un CV di 3.3% e 4.1% per Fit e Pri rispettivamente. Il dosaggio è lineare ($r > 0.999$) nel range 0.05-100 µmol/l.

I valori normali per Fit (<2.3 µmol/l) e Pri (<2.1 µmol/l) sono stati ottenuti dal dosaggio plasmatico di 20 soggetti sani. Questo metodo permette una rapida e semplice procedura di estrazione e una precisa quantificazione nel plasma degli acidi Pri e Fit senza le interferenze dovute alla presenza di acidi grassi insaturi normalmente riscontrate nelle metodiche in gas-cromatografia e spettrometria di massa comunemente usate.

(1) Lepage and Roy, J. Lipid. Res 1986; 27:114-20

DETERMINATION OF CHLORIDE IN SWEAT USING ION CHROMATOGRAPHY WITH SUPPRESSED CONDUCTIVITY DETECTION

Martini A.*, Leone L.*, Bignamini E.°, Bocco L.°, Brandino D.°, Volpato M.°

*Clinical Biochemistry Laboratory and °Laboratory of Pneumology, Department of Clinical Pathology, Children Hospital "Regina Margherita", 10126 Turin (I)

Background: Analytical applications with Ion Chromatography (IC) has gained wide interest in the last years, especially in the field of clinical chemistry. For cystic fibrosis (CF), the sweat test remains the "gold standard" for the diagnosis. The standard sweat test (1) involves the measurement of the sweat chloride (Cl⁻) eluted from a filter paper pad placed on the arm, after quantitative pilocarpine iontophoresis. Usually, the measure is performed with commercial "chloridometers". Positive tests were intended for [Cl⁻] > 60 mmol/L. The commonest causes of misdiagnosis are regarding analytical and pre-analytical aspects.

Aim: In order to improve the reproducibility and the repeatability, along with absence of interferences, of the sweat chloride measurement, an IC-HPLC technique with suppressed conductivity detection was developed.

Methods: 205 sweat samples, from pediatric patients (age 0,3 – 12 years) submitted to standard sweat test protocol (1), were analyzed for chloride measurement. The determination was concurrently performed with a chloridometer (mod. CMT10, Radiometer, Copenhagen, DE) and with an Ion Chromatograph with Suppressed Conductivity Detection (mod. DX-120, Dionex, CA). Specific technical-operative aspects for both instruments were set according to the manufactures. Calibration curve was established by opportune dilutions of a certified standard solution (100 mmol/l of [Cl⁻]). *Results:* the calibration curve was linear from 1 to 100 mmol/L of [Cl⁻] for chloridometer ($r = 0,9991$) and from 0.5 to 50 mmol/L for DX-120 ($r = 0,9968$). The imprecision of DX-120 was less than chloridometer: the coefficient of variation (C.V.) within-run was 2,3% vs. 4,7% at 25 mmol/L and 3,5% vs. 6,2% at 10 mmol/L; the C.V. between-run was 4,4% vs. 7,5% at 25 mmol/L and 5,6% vs. 8,7% at 10 mmol/L. Furthermore, a strong linear correlation was observed ($y[\text{DX-120}] = 0,989 x[\text{chloridometer}] - 0,033$; $r^2 = 0,986$).

Conclusions: the IC-HPLC technique with suppressed conductivity is an useful alternative approach to measure ions in biological fluids. One of the new applications is the determination of sweat chloride, the most important parameter for the diagnosis of CF. The RRT for Cl⁻ peak, using mobile phase provided by manufacturer, was 6,5 min., free from known interferences; the total analysis time for each sample injected was 30 min. The good repeatability and reproducibility showed by DX-120, although with limited linearity and productivity in respect to the chloridometer, ensure the same correct assignment of the disease class without misdiagnosis or elevately false positive results.

REFERENCES

(1) Gibson LE, Cook RE, Pediatrics, 23, 545-549, 1989.

CONFRONTO TRA METODICHE HPLC PER L'EMOGLOBINA GLICATA IN UNA CASISTICA DI PAZIENTI DIALIZZATI

Giordani E¹, Pegoretti G², Paleari R.³, Mosca A³, Schinella M.¹

¹Lab. Chim. Clinica Microbiol., Ospedale S. Maria del Carmine, Rovereto, Trento; ²Lab. Patol. Clin. 1, Osp. S. Chiara, Trento; ³Dip. Scienze Tecno. Biom., Università degli Studi di Milano

Introduzione. Diversi analizzatori HPLC utilizzabili per la misura dell'emoglobina glicata operano una separazione fisica della componente cosiddetta "labile". Ci sono attualmente diverse segnalazioni in letteratura che indicano che all'interno di tale frazione possono coeluire altre emoglobine minori, quali l'emoglobina carbamylata che si formerebbe in funzione della concentrazione di urea nel siero. Pertanto si è voluto valutare se in pazienti abitualmente sottoposti a trattamento di dialisi renale l'analisi HPLC dell'emoglobina glicata presenti anomalie cromatografiche e di quale entità, e quale possa essere la correlazione tra diversi tipi di metodiche.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati campioni di 188 pazienti afferenti abituali agli ambulatori di dialisi per diverse nefropatie. La concentrazione del glucosio, dell'urea e della creatinina è stata misurata mediante metodiche standard di chimica clinica. L'emoglobina glicata è stata misurata mediante i sistemi Menarini HA 8121 ed Eurogenetics Tosoh A1c 2.2 (G5). Ogni strumento HPLC è stato calibrato secondo le istruzioni della Ditta fornitrice.

Risultati. La misura dell'emoglobina glicata (Hb A_{1c}) ottenuta con i due sistemi analitici messi a confronto è risultata ben correlata ($r^2=0,99$) anche se si evidenziano lievi scostamenti tra i due metodi ($y_{\text{Menarini}} = 0,974x_{\text{Tosoh}} + 0,18$), giustificabili dalla differenza nelle calibrazioni. Una correlazione minore ma altrettanto significativa ($r^2 = 0,541$) è stata riscontrata tra le "altre" frazioni ("LA1c+" e "#") identificate e quantificate dai due strumenti. In entrambe le due strumentazioni la correlazione tra frazioni di cui sopra ed urea è risultata significativa (Tosoh: $r^2 = 0,124$; Menarini: $r^2 = 0,238$), mentre non significativa è risultata la correlazione con la creatinina. La correlazione tra Hb A_{1c} ed urea è risultata meno intensa di quella prima illustrata, e diversa nelle due strumentazioni (Tosoh: $r^2 = 0,050$; Menarini: $r^2 = 0,108$).

Conclusioni. I risultati ottenuti dimostrano che nel caso dei pazienti regolarmente sottoposti a dialisi renale si nota un'interferenza nelle frazioni emoglobiniche eluite in HPLC e confermano che in tali casi i valori di emoglobina glicata vanno interpretati con cautela.

Bibliografia. Chachou A, Randoux C, Millart H., Chanard J., Gillery P. Influence of in vivo carbamylation on HbA_{1c} measurements by various methods. Clin. Chem. Lab. Med. 2000;38:321-6.

A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR ANALYSING URINARY CALCULI USING HPLC CONDUCTIVITY AND UV DAD DETECTION

*Manunta A., Calvisi L., Canu G, Cherchi G.L., Mura G.L., °Pes G.M., Ganadu M.

Servizio e *Laboratorio di Nefrologia e Dialisi. Ospedale "A.Segni" P.O. Ozieri ASL 1- Sassari - Italy
°Cattedra di Biochimica Clinica. Università di Sassari

Urolithiasis is a common disease and among the most important causes of morbidity in patients with urinary tract disease. The chemical analysis of urinary calculi is essential to prevent the recurrence of lithiasis through dietary measures or drug therapy. The method proposed here provides rapid and accurate information regarding the chemical composition of urinary calculi, and its performance is higher than that of colorimetric methods currently available in the clinical laboratory. Therefore, it avoids the need of complex techniques such as X-ray diffraction and IR spectroscopy, which are available only in a more sophisticated laboratory setting.

Method: the renal calculus is subjected to macroscopic examination (i.e. size, colour, shape, weigh) then finely ground, and 10 mg of material is introduced in a vial, and solubilized in 0.3 mol/L boric acid at 45°C in a ultrasound bath. Then 50 µL of diluted solution are filtered (0.2 µm) and injected into HPLC.

System: Dionex DX 120 Ion Chromatograph, column AS4 4x150mm (ion-exchange) equipped with conductivity detector and UV detector DAD Hewlett Packard HP1090. The mobile phase is 18mM carbonate, 17mM bicarbonate with a flow rate of 1.5 mL/min. The separation is complete in about 12 min and gives the concentration of the following anions: chloride, nitrite, nitrate, bromide, sulphate, phosphate and oxalate through the conductivity detector, whereas uric acid is measured in the same chromatographic run with the UV detector at 280nm or 254nm.

With this method we have analysed a series of 100 urinary calculi in comparison with a qualitative chemical colorimetric assay (Merck, lot no.11003). The two methods gave similar results.

Conclusions: most urinary calculi showed the presence of uric acid (20%) and/or calcium oxalate/phosphate (70%), rarely of cystine (1%). The latter type of calculi has a particular appearance, easily noticed during the preparation of the sample and in this case other methods specific for cystine should be adopted

Petrarulo M., Marangella M., et al .
Clinical chemistry, 36,1642 (1990)

ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME (ACE) ACTIVITY DETERMINED BY HPLC DIRECTLY IN CULTURED HUMAN SKIN FIBROBLASTS

Paroni R., Fermo I., §Zagato L., #Zerbini G, *Barlassina C.

Lab. Tecniche Separative, §Unità di Nefrologia, #Lab. Patofisiologia Renale, IRCCS H San Raffaele, Milano, *Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Milano, Milano.

Aim of the study. To set up an HPLC method to monitor angiotensin-converting enzyme activity (ACE) using cultured human skin fibroblasts.

Cell Culture. Fibroblasts lines were derived from skin specimens obtained by excision from the anterior surface of the forearm. Cells were grown to confluence in MEM 10% FCS and made quiescent in MEM 0.3% FCS for ≥ 72 h before the assay.

ACE enzyme assay. The assay was based on the determination of the hippuric acid (HI) amount formed during incubation of the enzyme with the specific substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL). To set up the appropriate assay conditions we have evaluated the effect of HHL concentration (0.05-10 mM) and incubation time (1-120 min) on HI production, and the assay specificity incubating cells for 60 min with Captopril 0.03-10 μ M added to MEM before the assay. Assay solution: HHL at different concentrations, NaCl 145 mM, Tris -MOPS 10 mM pH 7.5, 37°C. The assay solution (200 μ L) was added directly to the adherent cells in 12 well cell culture cluster. After incubation, 180 μ L of the buffer were removed and the reaction stopped with 100 μ L H₃PO₄ 12%. The internal standard o-methyl hippuric acid (IS) (0.93 mM, 10 μ L) was added to the mixture and the HI generated extracted with 900 μ L ethyl acetate, dried, re-suspended with water (100 μ L) and injected in HPLC (20 μ L). Enzymatic activity was measured in triplicate subtracting the background value at T0 in ice. The HI formed in each well was normalized for the proteins content (nmol/mg prot). *HPLC conditions.* A RP C18 column was used (Beckman Ultrasphere 150X4,6 mm, 5 μ m) eluted at ambient temperature and at 1 ml/min with 1.0% H₃PO₄:CH₃CN (85:15, v:v). U.V. detector was set at 220 nm. Injections were performed by means of an autosampler.

Results. HI production increased linearly with the cells incubation time (0-120 min) and with the substrate concentration up to 1 mM. The V_{max} was 6.3 nmol/min/mg prot, while the Km was 0.433 mM. The assay specificity was demonstrated by the inhibition of the HI production at 98.2%, 97.8% and 94.6% with Captopril 10, 0.1, 0.03 μ M, respectively.

Conclusions. For subsequent experiments, 30 min of incubation and 1 mM HHL were chosen as the optimal conditions. HPLC avoided the use of a radioactive substrate, was a rapid, inexpensive and automated technique useful for screening the enzyme activity in a large set of patients according to different pharmacological stimulations or genetic conditions.

1) Cushman D.W. and Cheung H.S. Biochem. Pharmacol. 1971;20: 1637-1648.

DETERMINATION OF ANTIBODY SPECIFIC FOR CYTOPLASMIC NEUTROPHIL: METHODS TO COMPARE

Faricelli R., Gioia S., Filippi G, D'Amico V., D'Alleva L., Rabottini S., Martinotti S.

Laboratorio di Patologia Clinica II, Ospedale Clinicizzato "SS. Annunziata"

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are autoantibodies for cytoplasmic antigenic of neutrophil granulocyte. c-ANCA antibodies react with proteinase-3 (PR), which are proteins that are present on alpha azurophil granules giving an indirect immunofluorescence (IFI) with granule pattern of cytoplasmic neutrophil. p-ANCA antibodies have like a target myeloperoxidase (MPO) and leukocytic elastase giving (by IFI method) a pattern of perinuclear fluorescent on a slide fixed with ethanol or a cytoplasmic pattern on a slide fixed with formaldehyde. The presence of either anti-PR3 antibodies or anti-MPO antibodies is considered to be the principal serum markers of vasculitis. An alternative method for quantitative determination of either anti-PR3 (c-ANCA) antibodies or anti-MPO (p-ANCA) antibodies is an immunoenzymatic procedure (EIA). We have studied 90 patients in both hospital and day-hospital, who were affected by vasculitis. They are tested with c-ANCA and p-ANCA antibodies with IFI method (DASIT). We have found 8 patients positive for c-ANCA and none positive for p-ANCA (see Table 1). The same patients were screened with EIA method (ALIFAX) giving only one positive result for c-ANCA and 13 patients turned out to be positive for p-ANCA, discovering a dramatic discordance between IFI and EIA methods (see Table 1). We have made another test to be sure about this result: the ANCA COMBI test (BOUTY). This is an immune-enzymatic test, which analyzes the patient profile for 7 antigens, each one is in a little well on a single strip of plates. The antigens are PR3, MPO, BPI, elastase, cathepsin G, lysozyme, and lactoferrin. With this method we have evaluated the real positive result for IFI and EIA tests. While with IFI test only there was a difficult interpretation of various fluorescent patterns, this combined method however allowed us to screen other positive results as well. The reason of it that the positive result for BPI and elastase is correlated with c-ANCA, instead the positive result for cathepsin G, lysozyme, and lactoferrin is correlated with p-ANCA. It is shown on Table 1, that the 8 positive patients for c-ANCA (IFI) were confirmed by neither EIA nor by ANCA COMBI. Instead, the one positive result for c-ANCA and 13 positive patients for p-ANCA (EIA) are positive also with ANCA COMBI test.

CONCLUSION:

EAI test has shown a good correlation with ANCA COMBI test, that it is usually used in our laboratory. EAI test has advantage of being an automatic test, while IFI test is a manual method where the non-correct preparation of slides can lead to erroneous interpretation.

	c-anca IFI	p-anca IFI	c-anca EIA	p-anca EIA
Positivi	8	0	1	13
Negativi	82	90	89	77
Totale	90	90	90	90

RENIN MEASUREMENT TO EVALUATE THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM

Iervasi A., Emdin M., Masini S., Zucchelli G.C.

CNR, Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

The enzyme renin exists in both inactive (prorenin) and active form; active renin cleaves the substrate angiotensinogen into angiotensin I, which ultimately leads (in the presence of angiotensin converting enzyme) to the production of the biologically active angiotensin II. Therefore renin is a key-factor in the regulation of arterial pressure and hydrosodic metabolism.

The assessment of renin-angiotensin system has been commonly obtained by PRA (plasma renin activity) measurement; more recently direct immunoassay of renin (using antirenin specific antibodies) has been proposed. We evaluated the degree of activation of renin-angiotensin system in patients with heart failure (HF) using two different immunoassays for direct renin measurement; results have been also compared with the traditional PRA assay. Using the IRMA method (Renin III generation, Bio-Rad Marnes La Coquette, France), and the chemiluminescent immunoassay (CLIA; Nichols Advantage Direct Renin, CA, USA) - carried out on the fully automated Liaison system - samples (withdrawn after 30 minutes of supine position) from 25 normal subjects and 46 HF patients were analyzed. In addition 9 samples from 3 patients submitted to postural test and 6 samples from 3 patients submitted to captopril (ACE-inhibitor) test, have been also used for comparison.

The results produced by the 2 methods were well correlated: $r=0.96$; $CLIA=24.7+0.99IRMA$; $n=86$. Normal range resulted 15.1 ± 12.3 (mean \pm DS) $\mu IU/mL$, referred to the WHO International Reference Preparation, NIBSC code 68/35, while in HF patients, as expected, values were higher (290.4 ± 185.9).

The comparison with PRA measurement in HF patients gave a significant correlation: $r=0.92$, $renin=-2.87 + 27.5PRA$; $n=208$. To evaluate the percent of cryoactivation of prorenin in renin during sample preparation, we compared CLIA results obtained in 2 aliquotes of 43 samples, one kept at 4°C for at least 2 hour and one kept at room temperature, higher but not significant values ($p=0.5$) were observed at 4°C.

These preliminary results suggest that direct renin measurement shows satisfactory and suitable performance for clinical evaluation of renin-angiotensin system in HF patients. CLIA method provides several advantages as compared to the IRMA one due to the fully automated technique which allows better precision (CV observed assaying a control sample in 18 runs was 8%) and faster results.

MONITORAGGIO AEROBIOLOGICO DEI POLLINI NELL'AZIENDA SANITARIA LOCALE 22

Mazzarello M.G.¹, Cremonese L.², Ferrari M.¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche del Presidio Ospedaliero di Ovada; ²Ambulatorio di Allergologia del Presidio Ospedaliero di Novi Ligure.

Scopo del lavoro: Valutare le variazioni qualitative e quantitative di particelle di origine biologica e di interesse allergologico, quali i pollini e le spore fungine presenti nell'atmosfera.

Metodologia: Per il campionamento viene utilizzato il metodo volumetrico, basato sulla cattura per impatto delle particelle atmosferiche su una superficie, attraverso l'aspirazione di un volume d'aria noto. L'apparecchio in uso è il campionatore VPPS 2000, posizionato sulla terrazza dell'Ospedale S. Giacomo di Novi Ligure. L'aria aspirata viene indirizzata su un tamburo, mosso da un sistema ad orologeria, su cui è fissato un nastro di plastica trasparente che funge da superficie di deposito delle particelle campionate. Il nastro viene rimosso settimanalmente, suddiviso in segmenti corrispondenti ai singoli giorni di campionamento che, previa colorazione, vengono esaminati al microscopio.

Risultati: Il programma di monitoraggio aerobiologico è iniziato nel periodo primaverile-estivo del 2001, in cui: le *Gramineae* sono risultate a concentrazione più elevata nel periodo Giugno-Luglio (373 pollini/m³ nel mese di Giugno), le *Urticaceae* (*Parietaria*) hanno raggiunto la concentrazione massima a Luglio (45 pollini/m³) e le *Compositae* (*Ambrosia* e *Artemisia*) hanno presentato concentrazioni elevate a fine Agosto (58 pollini/m³). Dopo il periodo invernale, il programma di monitoraggio è ripreso a Febbraio 2002 in cui i pollini di *Cupressaceae*, dopo aver dominato i primi mesi dell'anno, sono calati con una netta diminuzione dalla metà di Aprile; i pollini di *Betulaceae* e *Corylaceae* si sono mantenute a livelli medi di concentrazione, in seguito alle diverse specie che fioriscono in periodi diversi. Negli ultimi rilevamenti, mese di Maggio, sono comparsi i primi pollini di *Gramineae* e di *Oleaceae* (Frassino).

Considerazioni conclusive: Il monitoraggio aerobiologico a livello locale si dimostra utile consentendo al Medico di Medicina Generale di impostare una terapia preventiva o di valutare l'eventuale peggioramento di una sintomatologia rinitica o asmatica assieme agli opportuni rimedi farmacologici. Il calendario pollinico viene pubblicato sui giornali locali, al fine di permettere ai Soggetti allergici di mettersi al riparo dalle complicanze evitando i luoghi dove è più alta la concentrazione, come l'aperta campagna e rivolgersi tempestivamente al proprio Medico.

Bibliografia: Mandrioli P, Comtois P, Levizzani. Methods in Aerobiology 1998. Pitagora Editrice

CONFRONTO TRA IFI ED ELISA NELLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTINUCLEO

Infantino M.¹, Bernardini S.^{1,2}, Zaccari G.³, Castellucci C.³, Cortese C.¹, Federici G.^{1,2}

¹Dip. di Medicina Interna, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma, Italia; ²Biochimica Clinica, Ospedale Pediatrico Bambino-Gesù IRCCS, Roma, Italia; ³Laboratorio di Biochimica, Ospedale S. Eugenio, Roma, Italia

La determinazione degli ANA è impiegata nella diagnosi di Lupus Eritematoso Sistemico e nello studio di altre malattie autoimmuni sistemiche (Sclerosi Sistemica, S. di Sjogren, Malattia Mista del Connettivo, Polimiosite/Dermatomiosite).

In un laboratorio di routine, la metodica ELISA risulta di facile esecuzione e automatizzazione e permette una rilevazione oggettiva del dato analitico pur presentando in genere un certo numero di falsi positivi (1). Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare la metodica ELISA con il dosaggio IFI.

Sono stati analizzati per la ricerca degli ANA 440 campioni di siero di pazienti afferenti al Policlinico Tor Vergata (età 3-87 anni, 63% F; 27% M). Per il dosaggio IFI è stata utilizzata la linea cellulare Hep-2 (Inova Diagnostics) con lettura eseguita indipendentemente da tre operatori; per il dosaggio ELISA qualitativo è stata utilizzata una metodica con nuclei di cellule HeLa adsorbiti su pozzetto e rilevazione con Ab-HRPO (RADIM) (variabilità intraserie 2.6%; interserie del 7.6%).

La determinazione degli ANA con i due metodi ha evidenziato una concordanza del 76% (n=333).

Il 14% dei pazienti (n=63) è risultato ELISA+/IFI-; il 10% (n=44) è risultato ELISA-/IFI+ (16 pattern nucleolari, 15 punteggiati, 1 nuclear-dots, 7 misto omogeneo/punteggiato, 4 misto punteggiato/nucleolare e 1 nuclear-dots/punteggiato).

Tali dati preliminari hanno fatto quindi rilevare, oltre agli attesi falsi positivi (ELISA+/IFI-), anche un certo numero (n=44) di soggetti che risultano ELISA- ed IFI+ a titoli variabili 1:80 (n=32), 1:160 (n=7), 1:320 (n=1), 1:640 (n=2), 1:1280 (n=2). Pur essendo la maggior parte dei pazienti (n=32) positivi IFI ad una bassa diluizione, che non garantisce la massima specificità, si presenta la necessità di un approfondimento del problema e di un ampliamento della casistica, possibilmente in studi prospettivi, al fine di stabilire la migliore correlazione con la malattia e la maggiore predittività del dato di laboratorio nei confronti dell'outcome clinico.

1) Griesmacher A, Pichl P. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(3):189-208.

OTTIMIZZAZIONE DEL CARICO DI LAVORO DI UNA U.O. DI AUTOIMMUNITÀ NELLA DIAGNOSI DELL'INTOLLERANZA AL GLUTINE

Rosa A.M., Cristino A., Antonetti R., Narducci P.

U.O. II Lab.-Maternità, Azienda Mista Università-Ospedali Riuniti di Foggia.

La recente scoperta della transglutaminasi (t-TG) umana come target antigenico degli EMA, ha portato a revisione l'algoritmo diagnostico dell'enteropatia glutine-dipendente, malattia a patogenesi autoimmune con predisposizione genetica.

Le tradizionali ricerche degli ARA, AGA e soprattutto degli EMA in IFI, sono state sostituite e/o affiancate dalla determinazione degli ab anti-t-TG. Il test, perfezionato dall'utilizzo della t-TG ricombinante di origine umana, ha raggiunto un grado di sensibilità e specificità (intorno al 99%) tali da ridefinire l'epidemiologia della malattia celiaca (1:61).

Scopo dello studio. L'utilità della ricerca degli ab anti t-TG nella conferma dei casi clinici di malattia celiaca, nel follow-up dei pazienti celiaci, nell'individuazione di forme subcliniche con strategie di testing (screening sierologici in pazienti a rischio) e nel challenge (reintroduzione del glutine), ha portato ad un notevole aumento di richieste. Scopo del nostro lavoro è stato pertanto quello di valutare una metodica per t-TG di recente introduzione, completamente automatizzata, messa a punto dalla BIOALLERGY sullo strumento ENEASYSTEM III mediante confronto con la metodica ELISA dell'EUROSPITAL in uso dal '98, quindi valutarne l'impatto sulla nostra organizzazione.

Metodo/Risultati. Sono stati selezionati 80 campioni di cui 40 con quadro sierologico positivo (AGA IgG/IgA, t-TG Eurospital) e 40 negativo. Il sistema Bioallergy ha mostrato una elevata specificità (100% dei negativi) ed un'ottima correlazione con il metodo Eurospital a livelli bassi e medi di positività. I sieri con valori borderline (n=9) si mantengono tali in entrambi i metodi. Le maggiori differenze si sono rilevate tra i campioni ad elevata positività dovute peraltro alla diversa standardizzazione impiegata e linearità dei due metodi che per l'Eurospital arriva a 20 U.A. e per la Bioallergy a 60 U.A.

Conclusioni. L'introduzione di test sierologici ad elevata sensibilità e specificità per la ricerca di ab anti t-TG ha contribuito a limitare il ricorso a tecniche invasive previste dai criteri ESPGAN come la biopsia intestinale (comunque "Gold Standard" di conferma). In tale ambito la nuova metodica t-TG della Bioallergy si pone quale strumento diagnostico affidabile e per sezioni di autoimmunità con carichi di lavoro importanti le performances analitiche e di automazione dell'ENEASYSTEM III garantiscono una riduzione del T.A.T., delle fonti di errore con un'ottima riproducibilità ed affidabilità.

	Negativi	Borderline	Positivi
Eurospital	40 <5 UA	5 <9 >7UA	31 >7 UA
Bioallergy	40 <2 UA	2 <9 >5UA	31 >5 UA

DIAGNOSTIC RECOMMENDATIONS IN AUTOIMMUNITY: EXPERIENCES OF AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA POLICLINICO DI MODENA

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

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Modena; ²Servizio Trasfusionale Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Modena.

The autoimmune diseases diagnosis represents an ever expanding field with a constant and progressive increase in demand for testing, due to a continuous expansion of knowledge, that leads clinicians to extend the use of testing in a more or less appropriate way.

In order to obtain a more appropriate use of testing, about one year ago, an approach was introduced, based on a diagnostic profile for autoimmune systemic diseases, whereby tests are performed step by step, based on the results or the diagnosis.

This same approach is not applicable to Outpatients for whom we are obliged to exclusively carry out tests requested by the AUSL doctors.

Our aim was to evaluate the request for ANA, ENA, DNA tests and their results between the Inpatients of ward of Rheumatology and Outpatients.

We collected data in a period of about ten months (July 2001-April 2002).

The comparison between Outpatients, for whom clinical information is not always available, and the selected Inpatients of Rheumatology, makes it clear that it is necessary to have a set of guidelines, which are now applied to Inpatients, in order to have correct use of testing for Outpatients in diagnostic evaluation, prognostic assessment and clinical decision making.

Riferimenti bibliografici:

AMERICAN COLLEGE OF PATHOLOGISTS. ARCH PATHOL LAB MED 200 JAN; 124 (1): 71-81

RECOMBINANT ENZYME IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF CELIAC DISEASE

Faricelli R., D'Amico V., Rabottini S., Pellicciotta A., Gioia S., Filippi G., Martinotti S.

Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale Clinicizzato "SS Annunziata" - Chieti, Italy.

Objectives. Aim of our work was to evaluate the new human transglutaminase immunoenzymatic test with recombinant enzyme (tTGr). Furthermore, tTGr was compared with guinea pig extractive antigen kits (tTGgp). EIA test results were compared with the results obtained from determination of antiendomysium IgA antibodies (EMA). Moreover, since the diagnostic hinge of celiac disease is still represented by duodenal histologic lesion, based on current ESPGAN criteria, correlation with biopsy data from tTGr positive patients was considered.

Material and methods. 320 samples from adults and children were assessed in our laboratory. For transglutaminase determination tTGr and tTGgp kits (form IPR) were used according to the sandwich immunoenzymatic method on microplate. In parallel, IgA EMA were performed on 308 out of the 320 samples, using indirect immunofluorescence on cryostatic sections of the distal third of monkey esophagous (from IPR) as further celiac disease marker.

Results. 51 samples were positive, 22 were uncertain and 247 were negative to tTGgp. Instead, 20 were positive, 17 were uncertain and 283 were negative to tTGr. Concerning the 308 sera subjected to EMA, 7 were positive, 2 were uncertain, and 298 were negative.

Fourteen (14) out of the 20 tTGr positive patients were also positive to intestinal biopsy, so confirming celiac disease. Six (6) patients refused intestinal biopsy (Tab.1).

Discussion and conclusions. Table 1 shows the 14 patients positive to intestinal biopsy. These patients belong to the group of the 20 patients in whom diagnosis was already done through non invasive screening methods (tTGr). Particularly, 5 were also EMA positive and with celiac disease, 2 were EMA uncertain and are on a gluten-free diet, the other 7 are EMA negative and on a gluten-free diet for longer. The 6 patients who refused intestinal biopsy belong to the category of patients in whom celiac disease could become overt because they are affected by type I diabetes or have relatives affected by celiac disease. Therefore, recombinant enzyme test yields less false positives as compared to the previous test used, and it allows a closer correlation with clinical-biopsy data, so improving test specificity.

Table 1: correlation between tTGr positivity and biopsy data.

	tTGr Positive	BIOPSY		
		Positive	Negative	Refused
EMA +	7	5	0	2
EMA Uncertain	2	2	0	0
EMA -	11	7	0	4
Total	20	14	0	6

REFERENCES

- Dieterich W, Ehnis T, Boner N. Identification of tissue transglutaminase as autoantigen of coeliac disease. *Nature Med* 1997; 3: 797-801

DOSAGGIO NEFELOMETRICO ED IMMUNOFISSAZIONE URINARIA: RISCONTRI ORGANIZZATIVI-METODOLOGICI

Loiodice L., Girone E., Troiano T., Colacicco A., Calabria T., Lovero R., Varraso L., Saracinio P.L.

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

Introduzione: Le plasmacellule producono immunoglobuline (Ig) le cui frazioni libere sono le catene leggere k e l. Qualora si verifica un aumento policlonale della produzione delle Ig con conseguente aumento delle catene K e/o $\bar{\epsilon}$ il loro rapporto K/ $\bar{\epsilon}$ rientra nei valori di range di normalità. L'aumento monoclonale porta ad una variazione delle K o delle $\bar{\epsilon}$ in modo tale che varia il loro rapporto, con la possibilità, dal punto di vista laboratoristico, di identificare la presenza o meno della proteina di B. J.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'eventuale presenza di proteina di B. J., utilizzando il dosaggio nefelometrico delle catene leggere, e confermandola mediante l'immunofissazione urinaria (I.F.)

Materiali e Metodi: Sono stati selezionati n° 37 campioni di urine di prima minzione giunti presso la nostra U.O.; su tali campioni sono stati effettuati: il dosaggio delle catene k e $\bar{\epsilon}$ con metodica immunochimico nefelometrica utilizzando lo strumento BN2 (Dade Bhering) e l'I.F. urinaria utilizzando un gel di agarosio con lo strumento AUTOIFE. Su tali campioni è stata valutata l'eventuale negatività per la ricerca della proteina di B. J. mediante i seguenti criteri: il valore del rapporto tra le catene k e $\bar{\epsilon}$ risulta nel range di normalità (v.n.0.75 – 4.50) negatività all'I.F. urinaria; mentre i criteri di positività sono stati: il valore del rapporto tra le catene k e $\bar{\epsilon}$ al di fuori del range di normalità; positività all'I.F.urinaria.

Risultati

Campioni positivi N=12	Positivi catena K immunofissazione nefelometria	Positivi catena $\bar{\epsilon}$ immunofissazione nefelometria
N° campioni	9	3

Campioni negativi N=25	Rapporto k / $\bar{\epsilon}$ normale nefelometria	Assenza catena k o $\bar{\epsilon}$ immunofissazione	Aumento policlonale delle catene k e $\bar{\epsilon}$ nefelometria
N° campioni	18	18	0
N° campioni	7	7	7

Conclusione: Il dosaggio nefelometrico per n°9 campioni mostra un aumento delle k urinarie non accompagnato dalla presenza di catene $\bar{\epsilon}$. Gli stessi casi analizzati utilizzando il metodo della I.F. presentano l'aumento monoclonale della catena interessata già evidenziata con le precedenti misurazioni. Solo 3 campioni mostrano al BN2 un aumento della $\bar{\epsilon}$ che confrontato con la banda delle $\bar{\epsilon}$ rilevata con l'I.F. è perfettamente corrispondente nel riscontro di proteinuria di B.J. Il dosaggio quantitativo nefelometrico, viene confermato dalla valutazione qualitativa dell'I.F. urinaria e può pertanto essere una valida alternativa nelle tipologie organizzative di piccoli laboratori nell'ottica di un razionale rapporto costo/benefici.

HIGHER EXPRESSION OF ACTIVATION MARKERS IN SYNOVIAL FLUID LYMPHOCYTES OF PSORIATIC ARTHRITIS (PsA) AND RHEUMATOID ARTHRITIS (RA).

Moretti T., Bernardini G., Strom R., Spadaio A. *, Ricceri V. *, Scivo R. *, Rinaldi T. *, Taccari E. *, Varesini G. *

Dipartimenti di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia e di *Terapia Medica, Università "La Sapienza", Roma.

The accumulation of activated T lymphocytes at sites of inflammation has a major role in the pathogenesis of arthritides such as PsA and RA. This study was performed with the aim of investigating and comparing, in these diseases, early and late activation lymphocyte markers.

Lymphocytes of peripheral blood (PB) and synovial fluid (SF) of 17 patients with PsA [M/F=14/3; mean age=46 yrs (range=24-66); mean disease duration=74 months (range=4-172)] and of 13 patients with RA [M/F=3/10; mean age=55 yrs (range=24-70); mean disease duration=99 months (range=4-196)] were examined by double-label flow cytometry for the surface expression of CD69 (a very early activation marker), CD25 (an early activation marker), CD71 and HLA-DR (mid-to late activation markers).

The expression of CD8 was, in both diseases, higher in SF than in PB lymphocytes, with a reduction of the CD4/CD8 ratio. SF lymphocytes exhibited also, as compared to the PB population, significantly higher expression levels of CD69, CD71 and HLA-DR, (p<0.0043; p<0.0019 and p<0.0059, respectively, in PsA; p<0.0064; p<0.0064 and p<0.0013, respectively, in RA). There was no significant difference between PsA and RA in the expression of either early or late activation markers. The percentage of lymphocytes expressing CD69 correlated negatively with disease duration (p<0.02).

In conclusion, the joint injury can be ascribed, in PsA and in RA, to a substantially similar inflammatory-driven process that occurs chiefly within the synovial microenvironment.

RELATIONSHIP BETWEEN ANTI DSDNA, ANTI NUCLEOSOMES, ANTI HISTONES AND ANTI POLY (dT)

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

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

Background. Anti-DNA, in particular anti double stranded DNA (ds-DNA), are autoantibodies that occurs in patients with systemic lupus erythematosus, (SLE), and show a heterogeneous pattern of individual anti-DNA specificity. Moreover the methods used for the anti-DNA measurement exhibit a wide spectrum of binding avidities detection, that influence the sensitivity and specificity of tests. The aim of this study is to evaluate the relationship between anti dsDNA detected with various methods, anti nucleosomes, anti histones and anti thymine reactive oxygen species modified DNA, the poly (dT). **Materials and methods.** Sera obtained from 43 individuals with clinical aspect well known (29 patients with S.L.E, 2 with Scleroderma, 2 with autoimmune hepatitis, and 10 healthy individuals) were evaluated by the commercial immunoblot method for anti poly (dT) and anti histones (INNO LIA ANA, Innogenetics Ghent Belgium), ELISA for anti dsDNA (Dia Medix), immunofluorescence (IFI) method on *Crithidia Luciliae* for anti dsDNA (INOVA, San Diego California), immunodot for anti nucleosomes (ALPHADIA, Wawre Belgium), ELISA for anti nucleosomes "H1 stripped" (INOVA, San Diego California). The dsDNA of ELISA method is obtained by recombinant technology. **Results.** The Kendal coefficient of concordance (Kcc) between anti ELISA dsDNA and IFI dsDNA was $w=0.8709$ ($p<0.0001$). The Kcc between nucleosomes and nucleosomes "H1 stripped" was $w=0.8464$ ($p<0.0001$). The Kcc between anti poly (dT) and anti IFI ds DNA was $w=0.6814$ ($p=0.0078$); between anti poly (dT) and anti ELISA ds DNA was $w=0.6715$ ($p=0.0113$). The Kcc between anti poly (dT) and anti nucleosomes was $w=0.7459$ ($p=0.003$); between anti poly (dT) and anti nucleosomes "H1 stripped" was $w=0.7958$ ($p<0.0001$). We have previously demonstrated that anti poly (dT) is often associated with anti histones (1). In fact the Kcc between anti histones and anti poly(dT) was $w=0.7998$ ($p<0.0001$). The Kcc in the sera with this double specificity was: with anti nucleosomes $w=0.7333$ ($p=0.0007$) and $w=0.8322$ ($p<0.0001$) with anti nucleosomes "H1 stripped". **Discussion.** The anti dsDNA assay methods concordance is good and, associated with the clinical data, although some patients with low active SLE were negative, confirm that the not conventional ELISA method, reveals mainly high avidity autoantibody. Likewise, anti nucleosomes assays show a good agreement. The anti poly (dT) demonstrated a remarkable better agreement with anti nucleosomes, particularly with the "H1 stripped" test, instead of anti dsDNA. The sera that show the double specificity, anti poly (dT) anti histones, have an high degree of concordance with anti nucleosomes "H1 stripped". This observation can be important on SLE pathogenesis and, considered also the clinical data, confirm the utility of the test.

1) J.Brusca et. Al Panminerva Med 2002;44:33-5

PHENOMENOLOGICAL ANALYSIS OF THE KINETIC OF CRYOIMMUNOGLOBULIN AGGREGATION

Ranalli R¹, Basile U.¹, Giardina B.², Galeotti T.¹, Di Stasio E.²

¹Istituto di Patologia Generale; ²Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo F. Vito 1, 00168 Roma

Cryoglobulins are immunoglobulins exhibiting temperature-dependent insolubility. Traditional assay to detect cryoglobulins requires prolonged (2-7 days) cold incubation of serum. We studied an alternative fast method based on the detection of cryoaggregating immunoglobulins by light scattering (turbidity). Cryoglobulinemic sera were dissolved at 55°C and the kinetic of aggregation was measured as an increase in turbidity at 10 °C ($\lambda=350$ nm). The measurements were performed at least three times on several samples showing high reproducibility. The aggregation curve displays a typical sigmoid shape and three parameters, characteristic of each sample, were used to describe the different phases of the aggregation process. The first phase is a lag period of low increase of turbidity (t_0), followed by a steep increase (*slope*) until a maximum turbidity value is reached (τ_{max}). The observation of lag phases in the aggregating kinetics of cryoglobulins suggests the hypothesis of a nucleation event on the basis of formation of aggregates of bigger size. The slope is a parameter indicating the rate of the aggregation process and could be strongly related to the possibility of the cryoglobulins to precipitate and induce vasculitis *in vivo*. The τ_{max} is correlated with the number and dimension of the aggregates and depends on cryoimmunoglobulin concentration.

The application of this simple and rapid assay for the detection and characterisation of cryoglobulins may provide helpful means for the evaluation of the clinical evolution of the causing disease. Moreover, the analysis of the kinetic of aggregation could lead information of crucial importance for the comprehension of the physiopathologic mechanism on the basis of cryoprecipitation.

Kallemuchikkal, U., Gorevic, P.D. (1999) Evaluation of cryoglobulins. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **123**, 119-125
Lawson, E.Q., Brandau, D.T., Trautman, P.A., Aziz, S.E., Middaugh, C.R. (1987) Kinetics of the precipitation of cryoimmunoglobulins. *Mol. Immunol.* **24**(9), 897-905

VALUTAZIONE DELLA PROTEINA-C REATTIVA IN PAZIENTI DIALIZZATI SOTTOPOSTI A TERAPIA COMBINATA ERITROPOIETINA-CARNITINA

Tresca E., *Liani M., *Trabassi E., Ciantra G., Savini F.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P.O. "S. Massimo" Penne (PE); *U.O. Nefrologia e Dialisi P.O. "S. Massimo" Penne (PE)

L'inflammation è una condizione frequentemente presente nei pazienti uremici. Essa è dovuta al rilascio di citochine (TNF, IL1) che esplicano, tra l'altro, un effetto inibitorio sull'eritropoiesi (1). La resistenza verso l'eritropoietina (EPO), farmaco in assoluto più efficace nel trattamento dell'anemia nel paziente uremico, è una complicanza frequentemente riscontrata. Recenti metanalisi, apparse in letteratura, indicano che la supplementazione con Carnitina migliora lo stato ematologico (minore richiesta di EPO) e apporta ulteriori benefici clinici a tali pazienti (2). Nel nostro studio abbiamo valutato l'azione combinata EPO-Carnitina su alcuni parametri di laboratorio dell'inflammation e in particolare sulla Proteina C reattiva (PCR) un sensibile indicatore dell'attività infiammatoria.

MATERIALI E METODI: Nel corso del 2001 sono stati seguiti 30 pazienti dializzati (età media 72 anni) sottoposti a trattamento dialitico per più di sei mesi e mantenuti nel range di Hb 11,0-11,5gr/dL con EPO (dosaggio medio 25UI/Kg/die). E' stata valutata la PCR, con metodo nefelometrico (BNaII Dade-Behring) e, mediante elettroforesi su gel di agarosio (Helena) la frazione α 1 globuline, per valutare globalmente altre proteine infiammatorie (α 1 anti tripsina, α 1 glicoproteina acida, alfa fetoproteina). Abbiamo diviso i pazienti in tre gruppi: gruppo A (solo EPO), gruppo B (EPO+1gr Carnitina) e gruppo C (EPO+ 2gr di Carnitina).

RISULTATI: I risultati sono riportati nella tabella espressi in valori medi:

Gruppi	PCR mg/L	α 1 %	p
A (EPO basale)	6,3 \pm 5,3DS	3,2 \pm 0,5DS	p<0,001
B (EPO+1gr Carnit.)	8,9 \pm 5,6DS	3,5 \pm 0,5DS	p<0,001
C (EPO+2gr Carnit.)	11,7 \pm 10,4DS	3,9 \pm 0,5DS	p<0,001

CONCLUSIONI: Dall'analisi dei risultati ottenuti si evidenzia come la PCR, dopo supplementazione con Carnitina, incrementa il suo valore medio con risposta dose dipendente (la frazione α 1 globuline aumenta in misura minore). Pertanto l'innalzamento della PCR, nei pazienti dializzati in terapia combinata EPO-Carnitina, non può essere considerato un indice affidabile per valutare lo stato infiammatorio.

Bibliografia:

- (1)Barany P. - Inflammation, serum C-reactive protein, and erythropoietin resistance. Eur. Renal Ass. Eur. Dialysis and Transplant Ass.-2001
- (2)Vesela E, Racek J, Trefil L, Jankovy'ch V, Pojer M. Effect of L-carnitine supplementation in hemodialysis patients. Nephron 2001 Jul;88(3):218-23

LADIAGNOSTICA DELLAMALATTIA CELIACA

*Cosio G, *Peer E., *Dal Checco P., *Daves M., *Floreani M., *Raffagnini A., °Pittschieler K.

*Laboratorio di Biochimica Clinica, °Divisione di Pediatria, Azienda Sanitaria di Bolzano

Il rapido sviluppo di test per la diagnostica sierologica di questa patologia ha creato imbarazzo nel medico pratico, confuso da tanta "abbondanza". Tra i diversi test i più utilizzati sono la determinazione degli anticorpi anti-gliadina (AGA) IgA ed IgG, autoanticorpi anti-endomisio su cordone ombelicale umano (HUC-EMA) ed anti-transglutaminasi con substrato ricombinante umano (anti-tTG) IgA ed IgG. I risultati di molti lavori sono concordi nel riportare elevate sensibilità e specificità diagnostiche per gli anti-tTG (>90%), sovrapponibili a quelle degli HUC-EMA e superiori a quelle degli anticorpi AGA IgA, ma soprattutto IgG. La determinazione degli anti-tTG ed AGA si effettua utilizzando dei metodi ELISA quantitativi, mentre quella degli HUC-EMA (qualitativa) si effettua in immunofluorescenza con valutazione istologica che da risposta di presenza o assenza degli anticorpi. Con questi presupposti si ritiene di dover razionalizzare a fini diagnostici l'impiego di questi tests secondo quanto segue: 1) a parità di sensibilità e specificità è preferibile l'uso di un test quantitativo ad uno qualitativo ed operatore dipendente e pertanto la determinazione degli anticorpi anti-tTG appare preferibile a quella degli EMA, 2) a parità di accuratezza diagnostica la possibilità di automazione suggerisce l'uso degli anticorpi anti-tTG rispetto agli EMA, 3) la minore sensibilità e specificità degli AGA ci consente di suggerire la loro sostituzione con la determinazione degli anti-tTG. E' necessario però ricordare che nei bambini di età inferiore a due anni, laddove gli HUC-EMA e la tTG possono risultare ancora non attendibili, e nel soggetto con deficit di IgA sieriche (è necessario quantificare le IgA totali per escludere un deficit di questa classe di Ig), solo i test di classe IgG, quali gli AGA-IgG e tTGA-IgG, possono orientare verso la corretta diagnosi.

E' possibile pertanto suggerire i seguenti iter per la diagnosi sierologica di malattia celiaca:

Pazienti di età < a 2 anni: dosaggi di IgA totali, AGA IgA ed IgG anti-tTG IgA ed IgG

Pazienti di età > a 2 anni: dosaggi di IgA totali, anti-tTG IgA ed IgG.

In futuro test, quali la determinazione degli HUC-EMA, andrebbero pertanto riservati a casi particolari su discrezione del clinico; in caso, invece, di monitoraggio di Pazienti già diagnosticati e sottoposti a dieta, i dosaggi da eseguire verranno richiesti dal Clinico sulla base della personale valutazione clinica. Il sospetto diagnostico "creato" dalle analisi sierologiche deve essere supportato per la diagnosi definitiva da un prelievo biotico dell'intestino tenue o della cute.

- 1) Fassano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis of celiac disease: an evolving spectrum. Gastroenterology; 2001;120:636-51.

BIOCOMPATIBILITÀ DI MEMBRANA E LIVELLI PLASMATICI DEL RECETTORE SOLUBILE "ANTAGONISTA" PER L'INTERLEUCHINA 6 (sgp130) IN PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO (HD).

Postiglione L.*, Conti A.*, Bisesti V.***, Altamura S.*, Memoli B.**

*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano"; **Dipartimento di Nefrologia, Università degli Studi di Napoli Federico II

Sono stati di recente segnalati aumentati livelli sierici dell'Interleuchina 6 (IL-6) e del suo recettore solubile "agonista" (sIL-6R) in pazienti dializzati con membrane di cuprophane (KI 58:417-424, 2000). Tale aumentata produzione probabilmente amplifica gli effetti pro-infiammatori della IL-6. La sgp130 rappresenta un altro componente del recettore solubile circolante per la IL-6, generato attraverso "shedding" dal recettore cellulare di membrana, con elevata affinità di legame per il complesso IL-6/sIL-6R e una attività biologica di tipo "antagonista" per IL-6. Abbiamo misurato i livelli sierici di sgp130 in 18 pazienti HD regolarmente dializzati con membrana di dialisi hemopham (He), in 15 pazienti regolarmente dializzati con membrane HD più biocompatibili (Bio) (PMMA, PS, PA etc.) e in 10 soggetti sani, come gruppo di controllo (Con). Abbiamo dosato la sgp130 mediante metodica Elisa utilizzando uno specifico anticorpo monoclonale murino (CD 130, Clone B-R3, Biosource Europe). Abbiamo, inoltre, dosato la proteina C-reattiva (CRP) e l'albumina sierica (s.alb.) mediante tecnica nefelometrica.

I risultati espressi come media \pm SD sono di seguito riportati:

	He	Bio	Con
Sgp 130 (ng/ml):	546.51 (101.2)*	476.88 (78.8)	411.92 (122.5)
CRP (mg/L):	11.95 (15.2)*	3.48 (2.5)	3.58 (2.8)
s.alb. (g/dl):	3.82 (0.4)	3.91 (0.5)	3.95 (0.4)

*p < 0.05 vs Bio e Con

I nostri risultati dimostrano che i livelli plasmatici di sgp 130 sono significativamente più elevati in He rispetto a Bio e Con. Questi elevati livelli circolanti di sgp130 sono associati con più elevati livelli di IL-6, come suggerito anche da elevati livelli di CRP in He. I livelli plasmatici di sgp 130 risultano positivamente correlati con CRP ($r = 0.338$, $p < 0.05$) e negativamente con la concentrazione di s.alb. ($r = 0.334$, $p < 0.05$). Queste elevate concentrazioni di recettore inibitorio, pertanto, non sono in grado di controbilanciare gli effetti pro-infiammatori dell'IL-6, come dimostrato dalla correlazione con CRP e s.alb.

SISTEMA DI MONITORAGGIO DEGLI ERRORI RELATIVI ALLA FASE DI ACCETTAZIONE

Altinier S., D'Osuldo A., Romice A., Vecchiato G, Bonvicini P., Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova (Italy)

L'individuazione degli errori, delle loro cause e delle soluzioni atte a rimuoverle, rappresenta uno degli aspetti centrali di un sistema qualità in ambito sanitario. A questo scopo presso la nostra struttura è stata effettuata la rilevazione delle irregolarità in fase di accettazione relativamente alle richieste provenienti da altri Ospedali ed Enti che afferiscono al Servizio di Medicina di Laboratorio. In un periodo di 6 mesi, sono stati scelti a campione 18 giorni e sono state controllate 2895 richieste. Sono state rilevate 24 irregolarità (range percentuale giornaliero 0.00 - 3.97%; media \pm D.S. (C.I. 95%) 0.86 ± 0.94 (0.39 - 1.32)). L'analisi di tali irregolarità ha fornito i seguenti risultati:

12 errori di imputazione anagrafica 50 %	5 cognome 2 nome 5 non classificati	1 svista 4 interpretazione 1 svista (inv. M/F) 1 interpretazione
12 errori di imputazione di analisi 50%	3 analisi in più 6 analisi in meno 3 analisi sbagliate	3 svista 1 svista, 5 allergeni 1 inversione codici 2 interpretazione

Relativamente alla tipologia, gli errori di imputazione anagrafica e gli errori di imputazione di analisi risultano ugualmente suddivisi; relativamente alla gravità gli errori di imputazione anagrafica non hanno pregiudicato la corretta refertazione mentre l'imputazione di analisi in meno (25% degli errori totali) o non corrispondenti a quelle richieste (12.5%) ha pregiudicato la corretta refertazione; relativamente alle cause, per gli errori di imputazione anagrafica (8.33%) si tratta di sviste e di errori di interpretazione (20.83%), mentre per l'imputazione di analisi, a parte le sviste (16.67%) e le inversioni di codice (4.17%), che rappresentano eventi assolutamente casuali, si tratta di errori di interpretazione (8.33%); vi sono inoltre 5 casi di analisi non accettate (20.83%) e si tratta comunque di allergeni: in 2 circostanze la causa è rappresentata dalla discrepanza tra quanto riportato sull'impegnativa e quanto riportato sul modulo di accompagnamento che elenca tutti gli allergeni eseguiti presso la struttura.

Azioni correttive: gli errori più gravi si riferiscono a quest'ultima evenienza, per cui può essere opportuno definire una modalità di richiesta in cui il modulo rappresenta il "documento di riferimento". Attualmente il trattamento di questo tipo di non conformità è rappresentato dalla modalità di conservazione dei campioni per almeno 4 giorni, permettendo quindi di eseguire a posteriori eventuali allergeni non accettati.

La percentuale di errori da noi riscontrati è notevolmente inferiore a quella riportata dalla letteratura, nondimeno questo sistema di monitoraggio può rappresentare un utile strumento per migliorare la qualità del servizio.

POLIMORFISMI DI MMP1, MMP3 E MMP9 NELLA GENESI E NELLA PROGRESSIONE DELL'AAA.

Bernini M., Erario M., *Ghilardi G., *De Monti M., Biondi L., Guagnellini E.

Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano
Clinica Chirurgica Università degli Studi di Milano

L'aneurisma dell'aorta addominale (AAA) è una patologia comune con un'incidenza stimata di circa 30 casi su 100.000 persone l'anno ad elevato tasso di mortalità (70%) laddove non si riesca ad intervenire chirurgicamente prima della rottura della parete vasale.

Enzimi appartenenti alla famiglia delle metalloproteinasi (MMP) sono coinvolti nell'alterazione strutturale della parete dell'aorta e la presenza di polimorfismi nella regione del promotore di alcune di queste metalloproteinasi ne altera i livelli di espressione. Scopo del nostro studio è quello di verificare se è possibile associare la presenza di polimorfismi di queste MMP all'insorgenza di AAA e al decorso clinico. Abbiamo caratterizzato il genotipo per MMP1 (Ins G-1067 1G/2G), MMP3 (Ins A-1171 5A/6A) e MMP9 (numero di CA repeat da 14 a 23) in 58 soggetti affetti da AAA e 119 controlli sani omogenei per età e sesso. Il DNA è stato estratto da sangue intero (Nucleospin - M Medical) e le regioni dei 3 diversi promotori delle suddette MMP sono state amplificate con la tecnica della PCR e successivamente sottoposte a sequenziamento diretto (Abi Prism 310- Perkin Elmer/Applied Biosystem). Un numero superiore a 19 CA repeats comporta un'aumentata espressione di MMP9, pertanto, arbitrariamente abbiamo suddiviso la nostra popolazione di controlli e pazienti, in inferiore e superiore a 19. Nei pazienti affetti da AAA abbiamo riscontrato una maggiore incidenza del genotipo >19 CA repeats (19 pazienti su 58 - 32.7%) rispetto alla popolazione di controllo (16 soggetti sani su 119 - 13.4%) con una significatività di $p < 0.05$. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella distribuzione dei polimorfismi di MMP1 e MMP3. I soggetti incorsi nella rottura dell'aneurisma hanno presentato un'incidenza dell'allele 5A, che codifica per una maggiore espressione della proteina MMP3, (8 pazienti su 23 - 34.8%) significativamente superiore ($p < 0.05$) ai pazienti in cui non si è avuto l'evento di rottura (3 pazienti su 35-8.5%). Nessuna differenza significativa per MMP1 e MMP9.

I nostri dati ci permettono di ipotizzare che:

- un elevato livello di espressione di MMP9 legato a questo polimorfismo, potrebbe essere un fattore predisponente alla formazione di AAA;
- l'aumentata espressione dei livelli di MMP3, legata al polimorfismo Ins A-1171 potrebbe essere, invece, un possibile fattore di rischio per la rottura dell'aneurisma stesso.

INFLUENZA DELL'IPERTENSIONE E DEL DIABETE SUI LIVELLI DI CISTATINA C EMATICA

Broggi M., Terreni A., Bardini G*, Bruschettoni A., Ognibene A., Pala L.*, Mosconi V., Caldini A., Piazza E., Rotella C.M.*

Laboratorio Centrale di Analisi Biochimico-Cliniche Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze; *Malattie del Metabolismo e del Ricambio, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università degli Studi di Firenze

La Cistatina C è una proteina a basso peso molecolare che viene liberamente filtrata a livello del glomerulo per essere poi quasi completamente riassorbita e catabolizzata dalle cellule del tubulo contorto prossimale e per questo motivo viene quindi utilizzata come marcatore biochimico endogeno di filtrazione glomerulare. L'ipertensione arteriosa è una condizione patologica che può dare origine a gravi complicanze cardiovascolari compromettendo la funzionalità renale.

Scopo di questo studio è verificare l'influenza dell'ipertensione arteriosa sui livelli di Cistatina C in soggetti diabetici di Tipo 2 e non diabetici. Sono stati studiati 246 soggetti (età tra 16 e 82 anni, 99 maschi, 147 femmine), di cui 121 non diabetici e 128 con diabete di Tipo 2. A tutti i soggetti, dopo indagine clinico-anamnestica per ipertensione, è stato eseguito un prelievo per il dosaggio di: Cistatina C (BNII, Dade Behring), urea, creatinina, emoglobina glicata, pannello lipidico e di funzionalità epatica. La clearance della creatinina è stata calcolata con la formula di Cockcroft and Gault. A tutti i soggetti non diabetici è stato inoltre effettuato un OGTT (75 g glucosio). Sono risultati affetti da ipertensione arteriosa 113 soggetti (64 diabetici e 49 non diabetici); gli altri 133 sono risultati non ipertesi (61 diabetici e 72 non diabetici). I valori mediani ed i range di Cistatina C (mg/L) ottenuti nei diversi gruppi sono riportati nella tabella (Test di Mann - Whitney).

oggetti	ipertesi	normotesi	p
non diabetici	0.73 (0.34 - 1.13)	0.60 (0.40 - 1.60)	0.009
diabetici	0.92 (0.57 - 2.77)	0.80 (0.56 - 1.29)	0.0034
p	<0.0001	<0.0001	

Questi risultati oltre a confermare un significativo incremento dei livelli di Cistatina C nei soggetti diabetici rispetto ai non diabetici, evidenziano un aumento dei valori di Cistatina C nei soggetti ipertesi rispetto ai normotesi in entrambe le categorie. I soggetti diabetici ipertesi, inoltre, mostrano livelli di Cistatina C più elevati degli ipertesi non diabetici. Questo sembra suggerire che i livelli di Cistatina C nei diabetici ipertesi siano il risultato della compromissione vascolare dovuta alla concomitante presenza di due fattori di rischio sinergici.

ALLELIC DISCRIMINATION OF C677T MTHFR POLYMORPHISM USING REAL TIME PCR

Liberatoscioli L.¹, Casciani S.¹, Allori P.¹, Bernardini S.¹, Federici G.^{1,2}, Cortese C.¹

¹Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Via di Montpellier 1, 00133 Roma, ²Bambino-Gesù - Children's Hospital-IRCCS, P.zza S. Onofrio 5, 00165 Rome.

Hyperhomocysteinemia can result from genetic or nutrient-related disturbances of homocysteine metabolism. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a folic acid-related enzyme involved in the remethylation of homocysteine to methionine. A common mutation in the MTHFR gene, involving a C-to-T substitution at nucleotide 677 (C677T), results in the conversion of alanine (Ala) to valine (Val) at position 226 of the protein. The C677T mutation reduces the specific activity of MTHFR, increases its thermolability, and has been reported to induce hyperhomocysteinemia.

We developed a fluorescent 5' nuclease assay using TaqMan system to detect C677T mutation. This assay takes advantage of 5' nuclease activity of Taq DNA polymerase to cause the cleavage of two allelic-specific probes, which hybridize to template DNA during the PCR. The probes are oligonucleotides double-labelled, at 5' with a reporter dye and at 3' with a quencher dye. Probe 1 (15 nucleotides) is complementary to wild-type sequence (Ala) and have FAM as reporter dye. Probe 2 (17 nucleotides) is complementary to mutant sequence (Val) and have VIC as reporter dye. When the probes is intact, the two fluorophores interact such that the emission of the reporter dye is quenched. During amplification, the probe is hydrolyzed, relieving the quenching of the reporter and resulting in an increase in its fluorescence intensity. The increase in fluorescence is measured on the ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems), and is a direct consequence of target amplification during PCR. This assay was applied to 89 sample of genomic DNA, extract from whole blood. In parallel, we screened the same samples with a previously described and well known restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Frosst et al. Nat Genet 1995;10:111-3) to compare and evaluate the 5' nuclease assay for MTHFR C677T genotyping.

The results show complete concordance of Real Time fluorescent 5' nuclease assay with traditional Polymerase Chain Reaction and restriction analysis assay, so, the TaqMan assay could be a rapid and automated method for MTHFR C677T genotyping.

SERUM λ LIGHT CHAINS DERIVE FROM A RESTRICTED GERMLINE GENE REPERTOIRE

Malinverni R., Perfetti V., Casarini S., Palladini G., Navazza V., Malazzi O., Merlini G.*

Int. Med. & Med. Oncol. *Biotech. Res. Labs Dept. of Biochemistry, University of Pavia, and IRCCS Policlinico S. Matteo, P.le Golgi 2, 27100 Pavia

Lambda light chain variable (V) regions are formed via rearrangement of a single V λ gene segment to a single J λ segment. The λ light chain loci on chromosome 22 has been fully characterized and is composed of thirty-one V λ (grouped in 10 families) and four J λ functional segments, together with a number of pseudogenes. Lambda light chains are present in approximately one third of serum immunoglobulins and actively participate in antibody response, however, no information is presently available on V λ -J λ germline gene usage. Since bone marrow plasma cells are the major source of circulating immunoglobulins, we have addressed this issue by nucleotide sequencing of expressed V λ regions from isolated marrow plasma cells from three normal donors (a total of 264 sequences). Complete V λ regions were obtained by means of an unbiased inverse-PCR strategy employing couples of primers that are both specific for constant region isotypes. Sequences were then matched in databases to identify rearranged germline V λ and J λ segments. V λ family usage was remarkably similar in the 3 normal individuals, and results were then pooled. Only the first 3 of the 10 V λ families, with the V λ III as the most popular (V λ I, 25%; V λ II, 24%; V λ III, 43%), contributed significantly to the repertoire of expressed polyclonal light chains. Analysis of gene usage at the level of germline genes indicated restriction. Just 5 of the 31 functional V λ segments were sufficient to encode approximately 50% of all polyclonal light chains, and these included 3 members of the λ III family (3*h*, 15%, 3*m* and 3*r*, 8% each; V λ III is the most complex family, accounting for 9 members), a λ II- (2*a*2, 12%) and a λ I member (1*e*, 8%). The most frequently expressed V λ gene, 3*h*, was rearranged at a remarkably similar frequency in the 3 normal individuals (11.9%; 14.6%; 13.8%). As regards the use of J λ segments, overexpression of J λ 2/3 was found in 67% of cases (J λ 1, 33%; J λ 7, 0%). All sequences contained somatic mutations (mean 7.4%, 95% CI, 7.0-7.8%), indicating passage through the germinal center. In conclusion, this study reports the first analysis of gene usage in λ light chains from marrow plasma cells. The polyclonal expressed repertoire is restricted, due to bias in the rearrangement of a few germline genes. Since restriction was similar in different individuals, it is likely that it is a general attribute of the λ light chain repertoire.

AUTOMAZIONE DEI PROCESSI DECISIONALI NELL'ANALISI DELLE URINE COMPLETE

Motta A., Trbos M., Locatelli M., Germagnoli L., Agape V.

Diagnostica e Ricerca Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132, Milano.

INTRODUZIONE. L'aumento della richiesta di analisi ematochimiche sempre più crescente non solo coinvolge l'area siero, ma coinvolge anche l'esame urine completo. Nonostante in questi ultimi anni l'automazione in questo campo sia stata oggetto di numerosi miglioramenti tecnologici (grazie all'introduzione dei citofluorimetri per la valutazione del sedimento urinario), l'impegno umano resta comunque elevato ed oneroso, tanto da richiedere in alcune realtà una presenza pressochè costante di 1 o 2 persone. **SCOPO.** Scopo del nostro lavoro è di ottimizzare il ciclo produttivo dell'esame urine completo, rendendolo nel limite del possibile, completamente automatizzato, al fine di delegare ad un algoritmo decisionale pre-impostato la valutazione e la validazione con conseguente rilascio al LIS dei campioni normali o congruenti per sedimento urinario ed esame chimico-fisico. **MATERIALI.** Sono stati impiegati 4 analizzatori automatici: 2 Atlas (Bayer) per l'esame chimico fisico e 2 UF100 (Dasit) per l'esame del sedimento. Tutti gli analizzatori utilizzati sono regolarmente in uso presso il nostro laboratorio. Tutti i dati degli analizzatori confluiscono su un pc che permette una gestione automatica della refertazione, mediante un software d'interfacciamento (LabOnline della ditta Omnilab) regolarmente in routine, ed adeguatamente programmato in linguaggio Delphi (da parte del personale di laboratorio) con appositi algoritmi decisionali al fine di valutare quali campioni debbano essere verificati dal laureato di settore (quindi bloccati) e quali possano essere automaticamente rilasciati al LIS. **METODI.** La valutazione sull'impatto organizzativo è stata eseguita confrontando i TAT medi (dal momento in cui il campione giunge in laboratorio, al momento in cui il suo risultato è reso disponibile ai reparti) dei campioni analizzati mediante l'uso del nostro algoritmo decisionale e i campioni valutati direttamente dal laureato di settore. **RISULTATI.** Abbiamo notato che il TAT medio di un campione nei limiti della norma o congruente per l'esame chimico-fisico e del sedimento è di circa 30 minuti se valutato con la validazione semiautomatica. Il TAT sale circa a 1 ora 30 minuti se il campione viene valutato direttamente dal laureato di settore, con punte di 2 ore e 30 minuti, a seconda della disponibilità del laureato di settore. **CONCLUSIONI.** La validazione semi automatica dei campioni permette una velocizzazione dei processi analitici, un minor impegno del personale ed una migliore valutazione dei sedimenti patologici o critici. **BIBLIOGRAFIA:** NCCLS documents GP-16A (ISBN1-56238), Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimen: approved guide linee.

APO E GENOTYPING: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN RESTRICTION ENDONUCLEASE MAPPING AND REVERSE-HYBRIDATION

Palmi I., Pellegrini M., Zuccaro P., Pacifici R.

Laboratorio Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità-Viale Regina Elena 299, 00161 Roma

Apolipoprotein (apo) E is an important arginine-rich circulating and tissue protein involved in cholesterol homeostasis and many other function. Apo E is a single chain polypeptide of 299 amino acid and has been mapped to chromosome 19. In humans, the structural gene locus for plasma Apo E is polymorphic: three co-dominant alleles, designed as $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$, encode for three major Apo E isoforms, E2, E3 and E4, differing from each other by single amino acid substitution. The most common allele, $\epsilon 3$, occurs with a frequency of approximately 75%, whereas the other two alleles occur with frequencies from 8% to 15%. The $\epsilon 4$ allele is associated with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease (AD). Although it seems not to be the direct cause of AD, it be considered as a possible susceptibility gene (1).

The aim of our study was to compare and evaluate two different methods for apoE genotyping by means of polymerase chain reaction (PCR). The first one is restriction isotyping by gene amplification and clavage with endonuclease. Genotype is read by the bands forming after the electrophoretic run in 4.5% agarose gel. The second one is a DNA amplification carried out by protocol of Inno genetic kit (INNO-LiPA APOE, Innogenetic - Pomezia, Rome) and typing test is based on reverse-hybridization principle. Results are interpreted by comparing the pattern of the reactive lines on the INNO-LIPA Apo E strips.

One hundred samples were analysed by the two methods. Genotypes frequency was 63% of $\epsilon 3/\epsilon 3$, 17% of $\epsilon 3/\epsilon 4$, 14% of $\epsilon 2/\epsilon 3$, 2% of $\epsilon 4/\epsilon 4$, 3% of $\epsilon 2/\epsilon 4$ and 1% of $\epsilon 2/\epsilon 2$. Obtained results are in agreement with those reported in international literature for Caucasians ($\chi^2 = 1.19$, $p = 0.75$) (2). The two methods applied showed a high level of concordance ($k = 0.982$). Only one sample showed a discordance between methods ($\epsilon 2/\epsilon 3$ by clavage with endonuclease, $\epsilon 2/\epsilon 2$ by kit Innolipa). Advantages of enzymatic method are: the low cost of test and the possibility of simultaneous analysis of several samples. However, the lengthy of method execution and an analytical result dependent from amount of amplified DNA are disadvantages. Advantages of Innolipa kit are: simplicity, rapid execution, test reliability and low amount of amplified DNA necessary for the test. The major disadvantage is the high cost of the kit

(1) Dupuy A.M., et al. Gerontology 2001; 47:213-218.

(2) Farrer L.A. et al. JAMA 1997; 278(16): 1349-56

IL DOSAGGIO DELLE PROTEINE URINARIE MEDIANTE STRISCE REATTIVE: ASPETTI ANALITICI E POST ANALITICI

Pirovano B., Benini A.G., Fenili D.*

*U.O. Medicina di Laboratorio, A.O. Ospedali Riuniti di Treviglio (BG)

Il dosaggio delle proteine urinarie mediante l'uso di strisce reattive è ancora poco definito sia per quanto riguarda la nomenclatura che per l'espressione dei risultati. Anche le linee guida redatte dalla NCCLS e dall'EUG sono contraddittorie per quanto attiene la nomenclatura e non forniscono indicazioni sulle modalità di espressione dei risultati. Per ovviare a queste carenze abbiamo utilizzato 437 campioni di urina sottoposti a elettroforesi per la caratterizzazione della proteinuria e 997 campioni provenienti dalla routine. In tutti i campioni sono stati dosati con metodi quantitativi la proteinuria totale (Pirogallolo-Molibdato), l'albuminuria (immunoturbidimetria) oltre alle proteine urinarie utilizzando la striscia reattiva (Atlas-Bayer). I risultati relativi ai diversi tipi di proteinuria evidenziano:

- una concordanza accettabile nell'ambito della proteinuria glomerulare con indici di correlazione pari a 0.881 (proteine totali) e 0.851 (Albumina)
- una scarsa concordanza nelle proteinurie tubulari tra risultati della striscia reattiva e quelli relativi al dosaggio delle proteine urinarie totali ($r=0.551$), mentre la correlazione con l'albumina è migliore ($r=0.761$)
- risultati simili a quelli osservati nelle proteinurie tubulari sono stati registrati nelle proteinurie da sovraccarico tubulare ($r=0.584$ proteine totali e $r=0.855$ per l'albumina).

In questo gruppo si osservano proteinurie superiori a 3 g/L e classificate dalla striscia reattiva nella classe di concentrazione di 0.2 g/L.

Per quanto attiene l'espressione dei risultati forniti dalla striscia reattiva in classi discontinue, abbiamo verificato i limiti fiduciali della misura (2.5°-97.5° percentile) riassunti nella tabella seguente:

classe di concentrazione (g/L)	Proteine totali (g/L)	Albumina (g/L)
<0.2	<0.2	<0.06
0.2	<0.2	<0.06 - 0.10
0.5	<0.2 - 0.80	0.08 - 0.44
1.0	0.2 - 1.2	0.08 - 0.98
3.0	1.1 - >3.0	0.96 - >3.0

L'insieme dei risultati ottenuti, peraltro attesi in relazione ai cromogeni impiegati (analoghi del verde di bromocresolo) ed ai dati di sensibilità del cromogeno per le diverse proteine inducono a:

1. modificare la nomenclatura da proteine totali ad albumina per evitare errori interpretativi grossolani;
2. spingere le ditte produttrici a standardizzare i risultati utilizzando come standard di riferimento l'albumina;
3. esprimere i risultati delle classi discontinue come intervallo di concentrazione e non come mediana delle misure.

ALTERAZIONI DEL PROMOTORE DEL GENE CODIFICANTE IL RECETTORE DI TIPO 2 DELLA SOMATOSTATINA (SST2) NEL NEUROBLASTOMA

Simi L., Pinzani P., Casini-Raggi C., Gerace L., Pazzagli M., Maggi M., Serio M., Orlando C.

La somatostatina (SS) ed i suoi analoghi stabili, sono in grado di inibire la proliferazione di cellule normali e tumorali esprimendo i recettori per SS. Tra i cinque sottotipi finora identificati, il sottotipo 2 (SST2) media l'effetto antiproliferativo più efficientemente degli altri e possiede la più alta affinità per l'analogo della somatostatina, octreotide. In un recente studio¹ condotto su carcinoma pancreatico, è stata individuata la presenza di due siti di polimorfismo a livello del promotore di sst2 in posizione -57 e -83 rispetto al sito di inizio della trascrizione. E' stato inoltre dimostrato che la presenza del polimorfismo in posizione -83 (A→G) introduce un sito di riconoscimento per il fattore trascrizionale NFI, il cui legame inibisce la trascrizione del gene per sst2. Gli obiettivi di questo studio preliminare sono stati essenzialmente due: lo sviluppo di una nuova metodica in SnapShot, confermata dal sequenziamento diretto della sequenza bersaglio per la ricerca di questi polimorfismi e la determinazione di una eventuale correlazione fra la presenza del polimorfismo e un'alterata espressione genica di sst2. I dati del polimorfismo nei campioni di neuroblastoma sono stati successivamente correlati con i livelli di espressione dell'mRNA per sst2, precedentemente determinati mediante real time RT-PCR quantitativa con ABI prism 7700.

La metodica in Multiplex SnapShot con ABI PRISM 310 permette l'individuazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e permette di condurre un rapido e affidabile screening su un largo numero di campioni per la presenza di più siti di polimorfismo in un'unica reazione. La chimica di tale metodica sfrutta il sequenziamento a singola base a partire da un primer non marcato complementare alla regione target che ibridizza fino alla base precedente al sito di polimorfismo. L'enzima AmpliTaq polymerase FS catalizza la reazione di polimerizzazione in presenza di dideossiligonucleotidi fluorescenti estendendo il nucleotide di una base alla volta. I nostri risultati sono stati inoltre confermati dal sequenziamento diretto, mediante Big Dye Terminator Kit, di una regione di 446bp del promotore per sst2 contenente i due siti di polimorfismo.

Dai nostri risultati emerge che: il polimorfismo in -83 e' strettamente in relazione a quello in -57 ed e' presente nel 14% dei neuroblastomi analizzati e nel 23% di quelli con bassa espressione di sst2. La presenza del polimorfismo e' associata ad una riduzione di circa dieci volte dell'espressione dell'mRNA per sst2 ed abbiamo evidenziato una sua correlazione con una ridotta sopravvivenza ed un avanzato stadio tumorale.

¹J. Torrisani, M. Bouisson, E. Puente, G Capella', P. Laurent-Puig, A. Berger, N. Vaysse, C. Susini, L. Buscail "Transcription of SST2 somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide polymorphism"

Gastroenterology 2001;120:200-209