

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN UNA POPOLAZIONE MOLISANA

Santojanni P. (1), Barletta A. (1), D'Amico M.V. (1), Petrilli G.A. (1), Colavecchia G. (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)

In questo lavoro presentiamo i dati di un'indagine, effettuata in collaborazione con l'U.O. di Diabetologia del P.O. e la Fondazione "Maugeri" di Pavia, operante nel P.O., rivolta a conoscere lo stato ossidativo di una popolazione afferente al Laboratorio Analisi del P.O. "G.Vietri" di Larino (CB). Sono stati valutati i livelli plasmatici di ROMs, trigliceridi, glicemia, colesterolo totale, LDL e HDL in 167 pazienti di età compresa tra 15 e 87 anni, suddivisi in 3 classi d'età. Con un colloquio si sono acquisite informazioni riguardanti le loro condizioni cliniche, l'ereditarietà per alcune patologie, lo stile di vita, l'uso di farmaci, il tipo di dieta. Inoltre, è stata effettuata la visita cardiologica, la misura della pressione arteriosa e quella dell'altezza e del peso per il calcolo del B.M.I. Per il dosaggio dei ROMs è stato utilizzato il kit Diacron applicato su tecnologia Hitachi. Per 50 pazienti (30%) i livelli di ROMs sono risultati maggiori o uguali a 340 U.Carr, per 117 (70%), invece sono risultati inferiori a tale valore-limite. La percentuale di soggetti con valori elevati di ROMs aumenta gradualmente con l'età, passando dal 21% nella classe d'età inferiore a 30 anni al 30,5% in quella compresa tra 30 e 60 anni e al 33,3% in quella di età superiore ai 60 anni. Esaminando le diverse patologie, sono apparsi significativi i dati relativi alla relazione tra radicali liberi e malattia diabetica. Infatti, dei 20 soggetti diabetici, 7 (35%) presentavano valori di ROMs maggiori di 340 U.Carr. Per quanto riguarda il B.M.I, i soggetti non obesi mostravano un'alta produzione di radicali solo nel 25% dei casi, percentuale che aumentava significativamente in quelli con obesità di grado II (38,5%) e in quelli di grado III (80%). Inoltre, mostravano uno stato ossidativo patologico anche il 35% dei pazienti con ipercolesterolemia (>200 mg/dl) ed il 50% di quelli con livelli plasmatici di LDL >160 mg/dl. I dati rivelano come nella popolazione esaminata sia frequente il riscontro di livelli plasmatici di ROMs indicativi di uno stress ossidativo e come esso sia correlato con patologie quali l'obesità, le dislipidemie, il diabete. Anche se per molte patologie la formazione dei radicali liberi sembra essere secondaria all'evento patologico primario, la loro propagazione può incrementare il danno. Per questo ci sembra importante la conoscenza dello stato ossidativo al fine di indirizzare ad un più adeguato intervento terapeutico sia dietetico che farmacologico.

D.J. Betteridge. *Metabolism*, Vol 49, N 2 Suppl 1 (February), 2000: pp3-8

BETA 2 MICROGLOBULINA URINARIA NEL NEONATO PREMATURO: UNA METODICA DEDICATA

Biagini G., Maiavacca R., Pietropaolo A.M., Felicetta I., Xaiz L., Orsi A.*, Torresani E.

Laboratorio di Chimica Clinica-Clinica del Lavoro -I.C.P.-Milano *Terapia Intensiva Neonatale I.C.P. -Milano

La β_2 microglobulina è una proteina a basso peso molecolare, prodotta dal fegato, che viene liberamente filtrata dal glomerulo, ma totalmente riassorbita nei tubuli contorti prossimali. La concentrazione urinaria di β_2 microglobulina riflette quindi il grado di disfunzione tubulare prossimale. I valori di β_2 microglobulina urinaria sono molto elevati nei neonati grandi prematuri, con peso alla nascita < 1500 g e con distress respiratorio e ciò fa pensare che la maturazione del tubulo prossimale è correlata all'età gestazionale e che il tubulo prossimale è molto sensibile agli insulti quali ipossia, ipercapnia, acidosi e ipotensione. Scopo del nostro lavoro è stato quello di identificare una metodica sulle urine che ci permetta di dosare i valori molto elevati di β_2 microglobulina urinaria dei neonati con danno tubulare senza dover ricorrere alla metodica su siero e che, nello stesso tempo, ci permetta di raggiungere una sensibilità molto bassa, come è necessario per i valori della proteina nell'adulto sano. Abbiamo utilizzato il reattivo ROCHE TINA QUANT β_2 microglobulina, in turbidimetria, che utilizza, per il siero, una curva costruita su 2 punti di calibrazione (bianco e calibratore) garantendo una linearità compresa fra 0.2 e 8 mg/l. Mentre è possibile, con l'opzione "decrease" diluire i campioni permettendo determinazioni di valori anche molto più elevati, non è invece possibile aumentare la sensibilità della curva per i valori inferiori a 0.2 mg/l come spesso accade per i campioni di urina. È stata allora costruita una nuova curva a 5 punti di calibrazione ottenuti diluendo automaticamente il calibratore originario per le β_2 microglobuline sieriche. Così facendo si riesce a raggiungere una sensibilità del metodo fino a $\approx 0 \mu\text{g/l}$ e ad avere una linearità fino a $\approx 2500 \mu\text{g/l}$. I 24 campioni di prematuri con di stress respiratorio e danno tubulare renale esaminati che presentavano valori di β_2 microglobulina elevati che cadevano nella zona di sovrapposizione delle due curve, l'urinaria e la sierica, hanno presentato un'ottima correlazione ($r = 0.998$). Possiamo quindi concludere che la metodica " β_2 microglobulina urinaria" ci permette di dosare, sulla stessa curva, campioni con valori compresi in un range molto ampio senza dover ricorrere ad un cambio di metodica che rende più complessa anche la gestione informatica del campione da esaminare.

Bibliografia:

V.Zanardo, M. Plebani: Urinary beta2 microglobulin excretion in prematures with respiratory di stress syndrome. *Child Nephrol.Urol.*, 10:135-138, 1990.

POLYAMINE BIOSYNTHETIC ACTIVITY IN HUMAN COLORECTAL CANCER

Linsalata M., D'Attoma B., Di Leo A.

Laboratorio di Biochimica, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis", viale della Resistenza 70013 Castellana Grotte (BA)

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are low molecular weight polycations required for cell proliferation and differentiation. Polyamine biosynthesis is known to increase with mitogenesis and elevated polyamine concentrations are found in tumour tissue including gastrointestinal mucosa (1). The metabolism of polyamines begins with the decarboxylation of ornithine to form putrescine and this step is governed by ornithine decarboxylase (ODC). S-adenosylmethionine decarboxylase (SAM-DC) provides aminopropyl groups for the synthesis of spermidine and spermine from putrescine. ODC and SAM-DC are key and rate-limiting enzymes in the polyamine biosynthetic pathway. In view of the importance of polyamine biosynthesis in tumorigenesis and its possible significance as a target site for chemotherapeutic intervention in cancer, our aim was to evaluate polyamine levels, ODC and SAM-DC activities in colorectal adenocarcinoma (CRA) and in normal surrounding mucosa.

Patients and Methods: sixteen patients (9 males and 7 females; mean age 66 yrs, range 40-87) with CRA entered the study. Polyamine levels were evaluated by HPLC. ODC and SAM-DC activities were assessed by radiometric technique. Data were analysed by Student's t-test for paired data.

Results: table below shows the different polyamine biosynthesis in the normal and neoplastic tissue. Significantly higher polyamine levels and enzymatic activities were found in CRA samples than in normal surrounding mucosa (polyamines are expressed as nmol/gr weight tissue. ODC and SAM-DC activities are expressed as pmolCO₂/h/mg prot). M±SD *p<0.05.

	Normal mucosa		Neoplastic tissue
Putrescine	13±7	*	39±37
Spermidine	155±112	*	332±202
Spermine	377±288	*	527±346
Total polyamines	545±401	*	897±567
ODC	40±44	*	268±310
SAM-DC	135±53	*	194±65

Conclusions: our results suggest that, in colorectal carcinoma, ODC and SAM-DC are able to induce an abnormal polyamines accumulation. Such information may contribute to diagnostic and/or therapeutic strategies involving colorectal cancer

References: (1) McCormack SA, Am.J.Physiol 260:G795-G806,1991.

FARNESYLTRANSFERASE ACTIVITY IN HUMAN FECES

Notarnicola M., Caruso M.G., Lorusso D.*, Demma I.*, Di Leo A.

Laboratorio di Biochimica, *Divisione di Chirurgia, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis" viale della Resistenza, 70013 Castellana Grotte (BA)

Postranslational modifications of proteins (including Ras p21 proteins, nuclear lamins A e B, etc.) by isoprenoid residues such as farnesyl and geranylgeranyl is emerging as a major mechanism by which cytosolic proteins interact with cellular membranes. The enzyme responsible for the farnesylation of these proteins is the Farnesyltransferase (Ftase) consisting in alpha e beta subunits. Both subunits are necessary for catalytic activity. Recently enhanced Ftase activity and expression of its mRNA, in human ovarian and skin basal cell carcinomas has been reported (1). Our preliminary data show that Ftase activity is present in human colon tissue and is higher in neoplastic colorectal mucosa than normal one. Since cells on the surface of the colonic mucosa are continuously shed into the lumen and eliminated from the intestinal tract in the faeces, aim of this study was to investigate the Ftase activity in faeces from colorectal cancer (CRC) patients compared to faeces from healthy subjects.

Patients and methods. A total of 10 subjects (4 males and 6 females, mean age 55±10 years) were enrolled in the study: 5 patients with CRC and 5 healthy subjects. A fresh stool sample was taken from CRC patients during preoperative period. All 10 fecal specimens were immediately frozen and lyophilized. One hundred mg of dried feces were homogenized in 5 ml of 25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF. An aliquot of 1 ml of fecal suspension was centrifuged at 10000 x g for 30 min and 10 µl of supernatant were used for Ftase activity assay (Farnesyl Transferase [³H] SPA Enzyme Assay, Amersham International, England).

Results. Fecal Ftase activity was present in all samples. The levels of Ftase activity were significantly higher in faeces from CRC patients than in those from healthy subjects (3.02±0.9 pmol/h/mg faeces vs 1.2±0.15 pmol/h/mg faeces, respectively, mean ± SD, P=0.01, Student's t-Test).

Conclusions. The elevated Ftase activity in faeces from CRC patients suggests a role of Ftase in cells neoplastic proliferation. Then, the detection of Ftase activity associated with genetic changes in normal and abnormal cells exfoliated from the intestinal tract could serve to provide markers for screening and early diagnosis of colorectal cancer.

References. 1) Khan S.G. Biochem, Biophys, Res Comm, 1996;220:795-801.

PROCALCITONIN (PCT) IN CRITICALLY ILL PATIENTS: A PILOT CLINICAL STUDY

Guidolin S., Vitali F., Del Giudice L., Vivaldo L., Pontecorvo C., Grillo T., Solca M.

Laboratorio Analisi ed Anestesia e Rianimazione, Presidio Ospedaliero "A. Uboldo" di Cernusco sul Naviglio, Azienda Ospedaliera di Melegnano, via Uboldo, 20063 Cernusco sul Naviglio (MI)

Markers of sepsis or, most interesting, impending sepsis have been actively investigated in Critical Care Medicine to allow for early diagnosis and treatment. PCT reportedly can fulfil the quest, as a molecule selectively produced in response to bacterial infection, and highly related to timing and severity of sepsis.

We prospectively measured PCT serum levels in a small cohort of critically ill patients, comparing it to different biological markers: five patients admitted to our Intensive Care Unit, at risk for developing sepsis, were enrolled after direct or surrogate informed consent to an observational prospective study. A blood sample was drawn daily for assessment of serum PCT, Interleukin 6 (IL-6), C reactive protein (CRP), leukocyte count and differential. PCT levels were measured by chemiluminescence assay, while IL-6 and CRP were performed by ELISA methods. Best medical care was provided to all patients, and clinical diagnosis of infection or sepsis was retrospectively made by the attending physician for each patient, without knowledge of the PCT results.

Patient A developed postoperative peritonitis, with progressive increase of PCT to 173 ng/ml; following abdominal surgery PCT dropped to 50 ng/ml, but never returned to normal, and the patient died in sepsis. Patient B was admitted for acute respiratory failure due to cardiogenic shock: PCT remained low until the patient developed bilateral nosocomial pneumonia (for which he eventually died), when it increased to 22 ng/ml, to never normalise. Patient C also developed nosocomial pneumonia after multiple trauma: PCT peaked to 10.4 ng/ml, to return to normal level (<0.5 ng/ml) after changing antimicrobial therapy. Patient D suffered for postoperative mediastinitis, with moderately elevated serum PCT (7 ng/ml), which decreased to normal after appropriate antibiotics administration. Patient E, admitted for multiple trauma and respiratory failure never developed bacterial infection or sepsis, and represented our control case: PCT levels remained always within normal limits. Neither IL-6 nor CRP levels were correlated either to PCT values or to the clinical status of the five patients. Leukocyte counts and differentials were far too erratic to allow for any meaningful correlation.

From our small group of patients, it appears that serum PCT might be a reliable indicator of bacterial infection and sepsis in critically ill patients.

STUDIO DEL PROFILO PROTEICO URINARIO: SIGNIFICATO ED USO CLINICO

Muratore M.T., Neri C., Carlini P., Feriozzi S., Ancarani E., Carrozza R.

Laboratorio Analisi, ASL Viterbo; ∞Nefrologia e Dialisi, Ospedale Belcolle, ASL Viterbo

Recentemente ha suscitato nuovo interesse lo studio qualitativo della proteinuria tramite l'impiego della tecnica di SDS-PAGE nella valutazione dei pazienti nefropatici. E' stato affermato che quadri clinici con prognosi diversa sono correlati a pattern proteici urinari differenti; tuttavia la SDS-PAGE è una tecnica costosa ed alla portata di un numero ristretto di Centri.

Scopo del lavoro è stato di valutare in modo random la proteinuria (P) con una tecnica di routine nefelometrica (BNII, DADE-BEHRING). Sono state esaminate le urine (secondo campione del mattino) provenienti dalla Nefrologia con dosaggio di P totale, albumina, transferrina, α 1 microglobulina, immunoglobuline G, α 2 macroglobulina. Tale indagine è stata denominata: profilo proteico urinario (PPU). La diagnosi clinica era posta con le comuni tecniche e di laboratorio e con la biopsia renale. Nel periodo ottobre 2000-gennaio 2001 sono stati eseguiti 146 dosaggi su 107 pazienti. I dosaggi sono risultati patologici in 101 pz per la P totale $1276,6 \pm 1805$, in 79 per l'albumina 885 ± 1234 , in 79 per la transferrina $35,88 \pm 55$ in 48 pz per α 1 microglobulina $29,1 \pm 27$, in 37 pz per le IgG $47,4 \pm 75$, in 12 pz per α 2 macroglobulina $1,214 \pm 1,5$ mg/L (M \pm SE).

Con il PPU è stato possibile individuare 4 pattern di P: P glomerulare selettiva (PGS), P tubulare (PT), P glomerulare non selettiva (PGNS) e P mista (PM). La tabella riassume la prevalenza dei tipi di P e delle diagnosi cliniche associate:

PPU	Tot	Gnf*	Vsc♦	Tx♥	Les▲	A⊗
PGS	5	2	1	1	1	0
PT	5	0	4	1	0	0
PGNS	27	12	9	2	0	4
PM	56	24	15	7	5	5

Legenda: *glomerulonefriti, ♦patologie vascolari, ♥trapianto, ▲nefrite lupica, ⊗ altre patologie

Vi era un'eccellente correlazione tra entità della P totale ed albuminuria (p=0.001); particolarmente interessante il dato che la α 2 macroglobulina, proteina di elevato peso molecolare, correla con la P ma sia completamente assente in corso di patologie renali proteinuriche come la sclerosi focale dove in realtà, non vi è coinvolgimento della membrana basale dei capillari. I nostri dati indicano che il PPU può essere di aiuto nella diagnostica nefrologica ed è auspicabile un suo uso più diffuso nel tentativo di correlare il suo andamento con la natura e la prognosi della nefropatia.

RB: Bazzi C et al *Kidney Int* 200,58:1732-1741

IL DOSAGGIO DELL' α -1-MICROGLOBULINA IN PAZIENTI CON MIELOMA MULTIPLO

Bosoni T., Pirolini L., Villani C., Valaperta S., Zappasodi P.*, Corso A.*

Servizio Analisi Chimico-Cliniche, *Divisione di Ematologia, I.R.C.C.S. Policlinico S. Matteo, Pavia

L'insorgenza del danno renale, nel decorso clinico del Mieloma Multiplo (MM), indotta dalla presenza intraluminale di catene leggere in elevata concentrazione, è associata ad una prognosi infausta. L'entità del danno tubulare può essere valutata in base all'escrezione urinaria di α -1-microglobulina, una glicoproteina a basso peso molecolare (P.M. 26/33Kd) sintetizzata a livello epatico, filtrata dal glomerulo e riassorbita quasi totalmente dal tubulo prossimale. In presenza di proteinuria di Bence Jones il riassorbimento di α -1-microglobulina viene inibito in seguito alla saturazione dei meccanismi che normalmente intervengono nel riassorbire e catabolizzare proteine a basso P.M. che si rinvergono a livello del tubulo prossimale. Alcuni studi dimostrano che l'inibizione è maggiore per le catene di tipo Lambda.

Obiettivo del nostro lavoro è valutare se l' α -1-microglobulina possa essere considerata indice attendibile di nefrotossicità.

La determinazione quantitativa dell' α -1-microglobulina è stata effettuata su campioni di urine delle 24 ore con metodo immunonefelometrico, utilizzando lo strumento BN II della ditta Dade-Behring.

L'indagine è stata condotta su 80 pazienti (uomini e donne) provenienti da ambulatori, day-hospital e reparto di degenza della Clinica Ematologica, con diagnosi di M.M. e classificati in due gruppi sulla base della positività/negatività della proteinuria di Bence Jones.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

N° Pazienti	Bence Jones	α 1 micro (mg/L)
35	Negativa	6.78 \pm 2.17
45	Positiva	58.10 \pm 40.18

Un gruppo di 10 pazienti sia B.J. positivi che negativi, sono stati monitorati per un anno con cadenza trimestrale, i risultati ottenuti hanno mostrato che all'aumentare della perdita di catene leggere anche l'escrezione di α -1-micro subisce un innalzamento, mentre una escrezione quantitativamente costante di catene leggere è accompagnata da una invariata eliminazione di α -1-microglobulina. Questo fenomeno è ancor più evidente per 3 pazienti con diagnosi di Mieloma Micromolecolare, per i quali l' α -1-micro presentava valori estremamente elevati: 169,5 \pm 25.5 mg/L. L'ottima correlazione ritrovata nel confronto tra i due gruppi di pazienti considerati ($p < 0,001$), mostra come l' α -1-microglobulina sia un indice accurato della funzionalità del tubulo prossimale, non subendo inoltre interferenze in presenza di ematuria o di infezioni delle vie urinarie.

Bibliografia: Fiorini F. " Patologia renale nel mieloma multiplo. MINERVA UROL.NEF.1995 ;87.68-74

ADEGUATEZZA DIALITICA E MEDIE MOLECOLE NEI PAZIENTI PEDIATRICI IN DIALISI PERITONEALE

Plebani M.¹, Montini G.², Mussap M.¹, Piatti R.¹, Milan Manani S.², Amici G.², Andretta B.², Zacchello G.²

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova; ²Dipartimento di Pediatria, Università di Padova

Introduzione. I danni secondari alla tossicità uremica derivano dall'accumulo di numerose sostanze, tra cui anche quelle appartenenti al gruppo delle medie molecole (300-5.000 D) quali la β_2 -microglobulina e la leptina. La β_2 -microglobulina non è infatti solo un marker, ma una vera e propria tossina uremica; tuttavia i suoi valori plasmatici sono influenzati dalla patologia di base del paziente o da patologie intercorrenti. Invece la cistatina C, per quanto non si abbiano ancora riscontri di una sua tossicità, può essere presa a modello delle altre proteine a basso peso molecolare in quanto non viene influenzata da fattori legati al paziente.

Scopo: 1) valutare il trasporto e la clearance peritoneale di sostanze di peso molecolare fino a 15 kD; 2) valutare il contributo della funzione renale residua per la clearance di queste molecole.

Metodi. Abbiamo studiato 10 bambini in dialisi peritoneale. 7 avevano una diuresi residua di 510+350 ml. I pazienti hanno eseguito per lo studio una dialisi peritoneale automatizzata con programma standardizzato. E' stata eseguita una clearance dell'inulina durante le 12 ore della dialisi; sono state misurate anche la cistatina C e la β_2 -microglobulina con metodo immunonefelometrico (Dade Behring, Milano), la creatinina e l'urea con metodi enzimatici in chimica secca (VitrosTM, Ortho Clinical Diagnostics, Milano).

Risultati. I valori di coefficienti dell'area di trasporto di massa (MTAC) presentano valori decrescenti secondo una funzione iperbolica in relazione al peso molecolare delle molecole studiate. Le concentrazioni plasmatiche e le clearance di urea e creatinina non presentano differenze significative tra i pazienti con o senza funzione renale residua. Le concentrazioni predialitiche di cistatina-C e β_2 -microglobulina sono risultate inferiori nei pazienti con diuresi conservata rispetto a quelli anurici. I valori plasmatici di cistatina C hanno mostrato una correlazione significativa con la clearance totale e renale dell'inulina. L'emivita dell'inulina, calcolata dalle curve di eliminazione, è in media di 24 \pm 12 ore, la sua scomparsa plasmatica è in media di 4,3 \pm 2,1 giorni.

Conclusioni. 1) la clearance dei soluti è progressivamente decrescente in funzione del peso molecolare; 2) la clearance dell'inulina avviene per il 47% a livello renale; 3) pazienti senza funzione renale residua presentano clearance inferiori e livelli plasmatici di cistatina C maggiori rispetto a quelli con diuresi residua, pur con buoni indici di adeguatezza dialitica per le piccole molecole.

INDUCTION OF HEAT SHOCK PROTEIN-72 DURING CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING PROTECTS THE MYOCARDIUM AGAINST OXIDATIVE DAMAGE

Dominijanni A., Chello M., Mastroberto P., Covino E., Gulletta E.

Units of Clinical Patology and Units of Cardiac Surgery
Department of Clinical and Experimental Medicine,
Medical School of Catanzaro, Italy

Objective. Recent studies have demonstrated that the induction of heat shock protein-72 (HSP 72) by a number of different stimuli exerts a protective effect on heart function after cardioplegic arrest. Based on these findings, we addressed the issue of whether the temperature of blood cardioplegia would induce changes in the expression of HSP72.

Methods. Forty patients scheduled to undergo aortocoronary bypass were randomly assigned to receive either cold or warm blood cardioplegia. In all patients HSP 72 and HSP 72 mRNA were assayed in biopsies from the right atrium at baseline, and during the reperfusion period conjugated dienes and malonyldialdeide from coronary sinus were also assayed.

Results. In both groups, myocardial expression of HSP-72 showed a similar pattern of increment throughout the reperfusion period, but the values of HSP72 band lengths were significantly higher in the warm group. Correspondingly, HSP72 mRNA levels showed a significant progressive increase in both groups in biopsies taken during the reperfusion period, but no significant difference was observed between groups. Moreover, conjugated dienes and malonyldialdeide release in the coronary sinus were significantly higher in the cold group.

Conclusions. Intermittent warm cardioplegia induces an increased expression of HSP72, which in turn is associated with a reduced myocardial cellular oxidative injury as indicated by reduced malonyldialdeide and conjugated dienes release. The use of warm blood cardioplegia represents therefore an attractive potential addition to current methods of myocardial protection.

SCREENING NEONATALE DI HPA/PKU: MIGLIORE SENSIBILITÀ CLINICA CON METODI QUANTITATIVI DI DETERMINAZIONE DI B-PHE

Corbetta C., Tiranti C., Melotti D., Vitali A.

Laboratorio Screening Neonatale e B.M.E., Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano.

Il Test di Guthrie, test semiquantitativo per la determinazione di fenilalanina (Phe) in campioni ematici neonatali, disidratati su carta da filtro (DBS), è stato ed è ancor oggi uno dei metodi più utilizzati, in Italia ed in altri paesi del mondo, nei programmi di screening neonatale delle Iperfenilalaninemie genetiche (HPA) e della Fenilchetonuria (PKU). L'utilizzazione, in sostituzione a tale test, di metodi quantitativi enzimatici con rivelatori colorimetrici, applicabili in automazione analitica totale, consente di ridurre nettamente il T.A.T. operativo del programma di screening e, soprattutto, di migliorarne la sensibilità (analitica e clinica). Il nostro laboratorio ha analizzato, dal 01.01.1977 al 30.09.1998, con Test di Guthrie, 1.573.728 neonati lombardi e, dal 01.10.1998 al 31.12.2000, 192.117 neonati con metodo enzimatico quantitativo, in automazione analitica totale (Bio-Rad CODA Phe Assay). Al fine di evidenziare il miglioramento delle performance di programma, ottenibili con l'utilizzazione di metodi quantitativi, abbiamo considerato i casi HPA tipo III selezionati dal programma di screening nei periodi A (01.01.96 - 30.09.98; test di Guthrie; 223.514 neonati) e B (01.10.98-31.12.00; metodo enzimatico; 192.117 neonate). Le HPA tipo III sono forme genetiche caratterizzate da un'attività enzimatica epatica residua di Phe-Idrossilasi più elevata, e, nei primi giorni di vita, presentano livelli ematici di Phe di poco superiori ai valori di riferimento normali. Il confronto dei risultati ottenuti nei due periodi (A: 9 casi; B: 32 casi) evidenzia una differente prevalenza di HPA III nella nostra regione, che varia da 1: 24.835 neonati nel periodo A a 1: 6.004 neonati nel periodo B. Negli stessi intervalli temporali, la prevalenza di casi di PKU e HPA tipo II (forme con livelli neonatali di Phe più elevati, selezionabili anche da metodi a minore sensibilità) non differisce significativamente (Periodo A: 16 casi; Periodo B: 12 casi). In conclusione, l'utilizzazione del test enzimatico quantitativo ha migliorato la sensibilità clinica del programma, determinando la selezione di un numero più elevato di HPA tipo III; tale miglioramento è correlabile alla migliore sensibilità analitica dei metodi enzimatici rispetto al test semiquantitativo di determinazione della Phe, come da noi precedentemente evidenziato (BC Biochimica Clinica, 1998,22, 5-6,401).
Bibliografia: Ann.Clin.Biochem.1994;31:140-146.

SCREENING PER LA DIAGNOSI BIOCHIMICA DELLA SINDROME DI SMITH LEMLI OPITZ: NOSTRA ESPERIENZA

Marchese N.¹, Canini S.¹, Biagini E.¹, Di Rocco M.², Famularo L.¹

1 Lab. Centrale di Analisi Chimico Cliniche; 2 II Div. di Pediatria IRCCS "G.Gaslini", L.go G.Gaslini 5, Genova

La sindrome di Smith-Lemli-Opitz (SLOS) è una malattia a trasmissione autosomica recessiva con frequenza 1:30.000 nascite, caratterizzata da una grave alterazione della biosintesi del colesterolo. E' dovuta a un deficit enzimatico della deidrocolesterolo-delta7-reduttasi, che catalizza l'ultima tappa della biosintesi endogena del colesterolo e causa una conseguente diminuzione della colesterolemia. Proprio la deprivazione di colesterolo nell'embrione e nel feto sarebbe responsabile di gravi alterazioni dello sviluppo, caratterizzate da ritardo motorio, microcefalia, facies e arti dismorfici. Un abbassamento dei livelli plasmatici di colesterolo è suggestivo per la diagnosi; per la conferma diagnostica vengono valutati i precursori del colesterolo ed in particolare il 7-deidrocolesterolo, che risulta abnormemente elevato e presenta uno spettro caratteristico all'ultravioletto (UV) con picchi a: 260, 272, 285 e 294 nm. Il dosaggio quantitativo di questo metabolita viene eseguito con gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di utilizzare un'analisi spettrofotometrica all'UV della frazione lipidica del siero come screening biochimico rapido per la diagnosi della SLOS. Dal 1996 ad oggi abbiamo esaminato 27 campioni di pazienti con caratteristiche cliniche suggestive per la malattia. I 27 pazienti avevano un'età compresa tra pochi giorni e 92 mesi: è stato determinato il colesterolo totale con metodi di routine, il suo valore variava da 63 a 303 mg/dL. La metodica da noi utilizzata prevede l'estrazione con 3 mL di n-Esano di 1 mL plasma ottenuto dopo centrifugazione di un campione di sangue in EDTA. Dopo centrifugazione, l'estratto viene evaporato sotto azoto concentrando il campione fino a 1 mL. Si allestiscono in contemporanea un controllo negativo da pool plasmatici di controlli normali e uno positivo aggiungendo al plasma una concentrazione nota di standard di 7-deidrocolesterolo. Per ciascun campione si esegue uno spettro UV da 320 a 250 nm (spettrofotometro Lambda 5 UV/VIS - Perkin Elmer) leggendo contro bianco reattivi. Il campione positivo mostra il tipico spettro con i massimi alle lunghezze d'onda caratteristiche. Noi abbiamo trovato 3 pazienti positivi che avevano il colesterolo totale notevolmente diminuito (dosaggio colesterolemia rispettivamente 80, 63, 81 mg/dL). La diagnosi è stata successivamente confermata con le tecniche di riferimento (GC-MS). Questo metodo rapido e poco costoso, da eseguirsi però subito dopo il prelievo, può essere utilmente impiegato come valida alternativa alle tecniche di riferimento. Guzzetta V. et al. *Acta Paediatr.* 1996; 85: 937-42.

LO SCREENING DEL LIQUIDO SEMINALE: PARAMETRI VALUTATI COME INDAGINE DI PRIMO LIVELLO NELLA DIAGNOSI DELL'INFERTILITÀ

Montani A., Bruno-Franco M., Vaneli S., Vimercati M.

Servizio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Presidio Ospedaliero di Casalpusterlengo, Dipartimento di Patologia Clinica ASL della Provincia di Lodi.

Scopo

In questo lavoro viene presentata l'attivazione di un servizio che si occupa dello studio di parametri biochimici, morfologici e funzionali facilmente attuabili da un laboratorio di analisi chimico cliniche e microbiologiche, nella valutazione del liquido seminale.

Materiale e Metodi

E' stato prevista di routine sia una valutazione morfologica funzionale che microbiologica. Tra i parametri biochimico, morfologici e funzionali si considera innanzitutto l'aspetto, il tempo di liquefazione, il pH e il volume del campione. Vengono poi condotte alcune indagini specifiche, tra cui un test al lattice qualitativo per la ricerca di anticorpi anti spermatozoo, un test di penetrazione in vitro, che considera la risalita degli spermatozoi in un capillare rivestito di muco cervicale bovino, valido sostituto del post coital test. Si determina poi la concentrazione nemaspermica diluendo opportunamente il campione in una soluzione di formalina e servendosi di appositi vetrini dotati di griglia. Per quanto riguarda la motilità si utilizza la camera di Mackler valutandola dopo un'ora e differenziando tre classi: forme dotate di mobilità progressiva, forme a mobilità non progressiva o in situ e forme immobili. Per la morfologia ci si serve di vetrini precolorati e si considerano le varie parti dello spermatozoo (testa, acrosoma, colletto e coda). Si effettua anche il dosaggio colorimetrico dello zinco e del fruttosio, essenzialmente per la valutazione della funzionalità delle vescicole seminali. Particolarmente utile ci è sembrato introdurre anche il test di vitalità che in base alla permeabilità della membrana plasmatica, permette di distinguere in modo rapido gli spermatozoi vivi da quelli non vitali, parametro estremamente utile nelle gravi forme di astenospermia

Conclusioni

Abbiamo in tal modo esaminato, nel corso dei primi tre mesi di attivazione del nostro servizio, 53 campioni per varie indicazioni diagnostiche e di questi 6, opportunamente preparati, sono stati capacitati per la fecondazione assistita.

Dalla nostra esperienza abbiamo valutato un buon grado di soddisfazione sia da parte del medico di base che del medico specialista. L'esame del liquido seminale risulta comunque difficilmente standardizzabile, a causa, soprattutto, dell'impossibilità di avviare programmi di controllo di qualità sia interno che esterno. I risultati ottenuti ci inducono a proseguire l'indagine, approfondendo lo studio dei casi da destinare alla fecondazione assistita.

IDENTIFICATION OF Y CHROMOSOME DELETIONS IN MALES WITH IDIOPATHIC INFERTILITY USING STS-PCR STRATEGY

Fattoruso O.*, Zarrilli S.#, De Rosa M.#, Buono P.*°, Lombardi G.#

°Ist. Universitario Navale, Facoltà di Scienze Motorie, Napoli, *Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, #Dip. di Endocrinologia e Oncologia Molecolare e Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Federico II", Napoli.

Infertility affects about 15% of the general population and in almost 50% of cases it is ascribed to the male partner. The genes related to oligo-azoospermia map on the AZF locus on the long arm of chromosome Y (Yq). Three nonoverlapping regions (AZFa, AZFb and AZFc) contain 90% of the AZF microdeletions responsible for azo-oligospermia. The screening of males in which disruption of spermatogenesis derives from Y chromosome microdeletions is important in case of anti-infertility treatment with intracytoplasmic sperm injection (ICSI), because the genetic defect underlying spermatogenic failure would be transmitted to male offspring.

In this study, microdeletion analysis of Yq was performed by polymerase chain reaction amplification of sequence-tagged sites (STS-PCR) in a group of 14 patients with azoospermia or severe oligozoospermia. For molecular analysis genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard techniques. For each sample we analyzed 18 STSs that span the AZFa,b,c regions, using specific STS primers. PCR products were separated on a 2% agarose gel and the microdeletions of a given marker were confirmed by repeating the reaction at least three times. In each STS amplification step, the DNA from a normal fertile man and from a female were used as positive and negative control, respectively.

We found Yq deletions in 2/14 infertile males analyzed (14.3%). In one subject, affected by azoospermia, regions AZFa, AZFb and AZFc were deleted, in the other subject, affected by oligozoospermia, the AZFc region was deleted. We conclude that STS-PCR is valuable for the screening of micro and macrodeletions in patients affected by idiopathic infertility. This method is more accurate (specific and detailed) than the cytogenetic test; the result is available in few days versus weeks with the cytogenetic test, and finally less expensive. We recommend that all males seeking ICSI treatment who have a sperm count <5 million/ml be screened with this procedure.

1. Vogt P.H. et al, *Human Molecular Genetics* (1996) 5 (7): 933-943.

This work was supported by grants from PRIN 97 (MURST, Rome), C.N.R., P.F. Biotechnology Rome and AIRC, Milan.

SCREENING COMBINATO PER SINDROME DI DOWN NEL 1° TRIMESTRE DI GRAVIDANZA: DUE STUDI PROSPETTICI PILOTA

Canini S., Carlucci S., Famularo L., Fedele A., Lorenzo G.***, Leone L.*, Pignatelli F.*, De Biasio P.***

Laboratorio Centrale Analisi, IRCCS "G. Gaslini", Genova
*Centro di Genetica Umana, Laboratorio Pignatelli, Lecce
**U.O. Ostetricia e Ginecologia, Ospedale V. Fazzi, Lecce
***U.O. Ostetricia e Ginecologia, IRCCS "G. Gaslini", Genova

Lo screening combinato nel 1° trimestre di gravidanza stima il rischio di sindrome di Down sulla base dei livelli della translucenza nucale (NT) misurata ecograficamente e di due marcatori biochimici del siero materno: la proteina plasmatica A specifica della gravidanza (PAPP-A) e la subunità β libera della hCG (free- β). In caso di feto affetto NT e free- β risultano aumentate e PAPP-A diminuita rispetto ai valori attesi per l'epoca gestazionale.

Presentiamo i risultati preliminari di due studi prospettici di applicazione di tale test.

Uno studio riguarda 1594 gravidanze singole con esito noto; l'età materna media era di 31 anni e l'epoca gestazionale media, stimata ecograficamente in base alla distanza cranio-podice (CRL) era di 12 settimane. PAPP-A e free- β sono state determinate mediante metodi IRMA (Ortho-Clinical Diagnostics). 57 gravide hanno presentato un rischio di sindrome di Down superiore al cut-off (1 su 350 a termine). Fra queste sono state individuate 2 sindromi di Down, 1 mosaico Turner, 1 triploidia, 1 feto affetto da grave patologia renale e 1 feto con una grave sindrome polimalformativa. Una gravida non a rischio al test, ma sottoposta ad amniocentesi, è risultata portatrice di un feto affetto da Trisomia 21.

L'altra casistica riguarda 592 gravidanze singole con esito noto; l'epoca gestazionale, l'età materna e il cut-off sono sovrapponibili a quelle del primo studio. Le determinazioni di PAPP-A e free- β sono state eseguite con metodi IFA su apparecchio automatico Kryptor (DASIT). 17 donne sono risultate a rischio aumentato; fra esse sono state individuate 1 sindrome di Down, 1 mosaico Trisomia 15 e una sindrome di Prune-Bell.

Si tratta di casistiche che per numerosità non sono ancora statisticamente significative, ma i risultati ottenuti nei due studi paralleli appaiono concordanti. Inoltre lo screening combinato nel 1° trimestre di gravidanza sembra essere predittivo non solo per la sindrome di Down, ma anche per altre patologie fetali correlate e non ad anomalie cromosomiche.

Prenat Diagn 1999; 19: 360-363.

VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA *HELICOBACTER PYLORI* (H.P.), IN UN CAMPIONE DI POPOLAZIONE DI BARI E PROVINCIA, MEDIANTE L'USO DELL'UREA BREATH TEST CON CARBONIO ¹³C (UBT)

Cleopazzo E., Mileti A., Lovero R., Minunno V., Pansini N.

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

L'H.P. è un batterio gram negativo ospite dello stomaco e del duodeno. È considerato l'agente eziologico delle gastriti essendo la principale causa di gastrite cronica non autoimmune e svolge un ruolo fondamentale nella malattia peptica sia duodenale che gastrica.

Scopo del lavoro: È stato quello di valutare la prevalenza dell'infezione da H.P. in un campione di popolazione proveniente da Bari e provincia, utilizzando una metodica non invasiva U.B.T.

Materiali e Metodi Dal gennaio 1999 al dicembre 2000 sono stati sottoposti presso la nostra U.O. ad U.B.T., 1100 pazienti. Età: Mediana 43 (Range di età 4 – 87) 95 CI mediana 41 – 45 95th = 73 Maschi 491 (44.63%) Età : Mediana 43 (Range di età 4 – 87) 95 CI mediana 41 – 45 95th = 73 Femmine 609 (55.37%) Età : Mediana 43 (range 5 – 87) 95CI mediana 41 – 45 95th = 73 La metodica da noi utilizzata prevede che il paziente non abbia assunto, nei 15 giorni precedenti l'esecuzione del test, farmaci quali: antibiotici, antinfiammatori, antiacidi, inibitori della pompa protonica, H₂ antagonisti, non abbia fumato da 24 ore e sia a digiuno da almeno da due ore utilizzando la seguente procedura: 1) un campione di espirato basale 2) somministrazione di 75 mg di urea marcata con carbonio ¹³C disciolta in 200 ml di succo di arancia non zuccherato 3) un campione di espirato dopo 30 minuti dalla somministrazione dell'urea L'analisi dell'espirato è stata eseguita mediante l'utilizzo dell'analizzatore all'infrarosso per isotopi stabili IRIS (Byk Golden Italia) la valutazione della risposta viene effettuata in DOB (δ over baseline) (v.n. < 5%).

Risultati: Soggetti positivi n° 460 (41.82%) Soggetti negativi n° 640 (58.18%), Maschi negativi N° 256 (44.68%) Età : Mediana 41 (range 4 – 84) 95% C.I: per la mediana 38.42 – 43.27 95th=73.2 Maschi positivi N° 205 (44.56%) Età : Mediana 44 (range 5 – 87) 95% C.I: per la mediana 41 – 46.53 95th 72.25 Donne negative N° 205 (55.32%) Età: Mediana 41.5 (range 5 – 87) 95% C.I: per la mediana 37.56 – 44.43 95th =73 Donne positive N°255 (55.43%) Età: Mediana 46 (range 5 – 85) 95% C.I: per la mediana 41 – 49.15 95th = 72.

Conclusioni: L'estrema affidabilità, praticità, ed assoluta tollerabilità del test fa sì che può essere impiegato come screening, sia per i pazienti che devono essere sottoposti ad endoscopia, sia per il follow – up a lungo termine in quelli sottoposti a terapia eradicante. Ciò premesso l'UBT rappresenta attualmente uno strumento diagnostico con una elevatissima accuratezza per le infezioni da H.P. anche se, a tutt'oggi, in riferimento agli altri test manca una standardizzazione della metodica utilizzata.

ELEVATED AMNIOTIC FLUID C-REACTIVE PROTEIN IS A MARKER FOR PRETERM DELIVERY

Melzi G.V.¹, Bossi G.¹, Finazzi S.¹, Merlini P.², Ghezzi F.¹, Franchi M.¹, Balestreri D.¹, Bolis P.F.¹

¹University of Insubria, Varese, Italy.

²University of Pavia, Pavia, Italy.

A preexisting intrauterine inflammation in the first half of gestation, has been proposed as a possible condition leading to preterm delivery (PTD). Indeed, elevated levels of inflammatory mediators (e.g., IL-6, TNF) in midtrimester amniotic fluid (AF) have been found in case of PTD and/or spontaneous abortion. The objective of this study was to investigate if AF C-reactive protein level (CRP) at the time of genetic amniocentesis is a marker for spontaneous preterm delivery before 34 and 37 weeks of gestation.

MATERIALS AND METHODS: 306 women undergoing genetic amniocentesis between 15 and 18 weeks of gestation with 1) singleton gestation, 2) uneventful pregnancy course prior to the amniocentesis, and 3) absence of fetal abnormalities were included in the study. Patients with abnormal karyotype were excluded. CRP was measured in the AF and in maternal blood (MB) immediately after genetic amniocentesis. CRP concentrations were determined using a nephelometric immunoassay (N High Sensitivity CRP, Dade Behring Diagnostics) on Dade Behring Nephelometer II (BNII) according to the recommendations of the manufacturer. All patients were followed until delivery for the occurrence of pregnancy complications. Non parametric tests and ROC curve analysis were used for statistical purposes.

RESULTS: The prevalence of spontaneous PTD before 34 and 37 weeks was 3.3% (10/306) and 8.5% (26/306), respectively. Women with PTD < 37 weeks had a higher median (range) AF CRP concentration than those who delivered at term [113.3 ng/mL (16-623) vs. 57.8 ng/mL (0-808.9), p<0.005]. Women with PTD<34 weeks had a higher median (range) AF CRP concentration than those who delivered at term [183.8 ng/mL (46.5-447 vs. 57.8 ng/mL (0-808.9), p<0.005]. No correlation was found between AF-CRP and MB-CRP. No relationship was found between MB-CRP and PTD either before 34 or before 37 weeks. AF-CRP > 110 ng/mL had a sensitivity of 80.8% and a specificity of 69.5% in the prediction of spontaneous PTD<34 weeks.

CONCLUSION: AF-CRP at the time of genetic amniocentesis is a simple, fast, and cheap method to identify women at risk for PTD< 34 weeks of gestations. This study supports the theory that a subclinical intrauterine/fetal inflammatory process early in gestation may be important for the occurrence of PTD in the second half of gestation.

IPEROMOCISTEINEMIA, GENOTIPO MTHFR E LIVELLI VITAMINICI NELLE PATOLOGIE VASCOLARI

Melotti D., *Belletti S., °Seia M., °Ambrosioni A., Alba P., Tavazzani M., *Costantini A., Corbetta C.

Laboratorio Screening Neonatale e BME, °Laboratorio Genetica Medica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento, *Istituto di Chirurgia Vascolare e Angiologia, Università degli Studi - Milano.

L'aumento della concentrazione plasmatica di Omocisteina (HCY), anche di livello moderato, è stata ripetutamente descritta come potenziale fattore di rischio per patologia vascolare ostruttiva ed aneurismatica; i valori plasmatici di HCY sono influenzati dall'apporto dietetico di cofattori vitaminici (Folati, Vit.B6, Vit.B12), indispensabili per il suo metabolismo e da mutazioni genetiche dei principali enzimi coinvolti: Cistationina- β -Sintetasi e Metilentetraidrofolato riduttasi (MTHFR). Di recente è stata descritto un polimorfismo dell'enzima MTHFR (C677T), in grado di alterarne la funzionalità, rendendolo termolabile: questo produrrebbe iperomocisteinemia (HHCY), soprattutto in presenza di uno scarso apporto vitaminico nutrizionale. In questo studio, si è ricercata la presenza del polimorfismo C677T in un gruppo di 40 pazienti con arteriopatia obliterante sclerotica agli arti inferiori, aneurisma dell'aorta addominale o stenosi carotidea, tutti con HHCY (mediana= 19.1 μ Mol/l), valutandone eventuali relazioni con i livelli di Folati e Vit.B12. Si è rilevata una condizione di omozigosi (TT) in 11 (27.5%) pazienti, mentre 18 (45%) sono risultati eterozigoti (CT) ed 11 (27.5%) con genotipo normale (CC). Il valore di mediana di HCY è risultato significativamente più alto nel gruppo di pazienti omozigoti (=31.04 μ Mol/l) rispetto agli eterozigoti (=15.51 μ Mol/l; $p < 0.05$) ed ai normali (= 15.56 μ Mol/l $p < 0.05$). Non si è riscontrata una correlazione inversa tra HCY ed i fattori vitaminici, tutti peraltro mediamente compresi in ridotti valori di concentrazione (Folati= 3.97 ng/ml; Vit. B12= 344.5 pg/ml), sia nel totale dei pazienti sia nei singoli gruppi; allo stesso modo per i livelli di Folati e Vit.B12, non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi. I risultati ottenuti sembrano pertanto evidenziare un prevalente ruolo del fattore genetico, rispetto allo status vitaminico, sui livelli di HCY, nei pazienti con patologia vascolare ostruttiva ed aneurismatica: il numero limitato di casi indagati consiglia comunque un ampliamento dello studio per meglio definire, nell'eziologia di tali patologie, l'interazione tra le condizioni di iperomocisteinemia, fattori genetici (omo/eterozigosi per il polimorfismo C677T) e livelli dei cofattori vitaminici.

VALORI SERICI DI FERRITINA NELLE NEOPLASIE HIV-CORRELATE. ESPERIENZA PERSONALE

Torresin A.*, Penco G.*, Cassola G.*, Giuliano C.°, Campanella A.°

*SC Malattie infettive; °Servizio Analisi - Ospedali Galliera, Genova

In corso di infezione da HIV i valori serici di ferritina (FER) vengono vantaggiosamente utilizzati nella diagnosi di eventi acuti, di manifestazioni opportunistiche, nel monitoraggio del sovraccarico marziale, del deficit immunitario e della ricostituzione immune dopo terapia. Abbiamo esaminato una popolazione di pazienti HIV positivi, affetti da neoplasia, con lo scopo di evidenziare eventuali correlazioni tra il comportamento della FER serica e la malattia neoplastica correlata all'HIV. FER e' stata misurata (sistema MEIA, Abbott), insieme alla conta dei linfociti CD4 (citofluorimetria, Beckton Dickinson), alla carica virale (metodica NASBA), ai valori di interleuchina 6 (Il6) e tumor necrosis factor alpha (TNF) (entrambi con chemiluminescenza, Medical System) alla diagnosi, all'ultimo follow-up, e durante la chemioterapia in 39 pazienti, di cui 7 donne e 32 uomini, di età compresa tra i 24 e i 61 anni (media 40), suddivisi in due gruppi: 24 pazienti con sarcoma di Kaposi (KS); 15 pazienti con malattie linfoproliferative (LPD), 13 linfomi non-Hodgkin, 2 m. di Hodgkin. L'analisi statistica e' stata eseguita col test t di Student. Al momento della DIAGNOSI di malattia neoplastica non si sono osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda i valori di FER e dei linfociti CD4, mentre Il6 e la carica virale raggiungevano valori superiori nel KS ($P < 0.05$) e il TNF era più elevato nei pazienti con LPD ($P < 0.1$). Al FOLLOW-UP di pazienti con KS o LPD in remissione completa o parziale i parametri esaminati presentavano valori sovrapponibili. Nel gruppo dei KS, i pazienti chemio-trattati presentavano valori decisamente superiori, in particolare di TNF ($P < 0.005$), con conte di CD4 inferiori, rispetto a pazienti con analogia patologia ma che non necessitavano di terapia. Nel pazienti DECEDUTI soltanto la FER era uniformemente alta in entrambi i gruppi, mentre Il6 era significativamente più elevata ($P < 0.1$) e i CD4 ed il TNF statisticamente inferiori ($P < 0.025$) nei pazienti col KS. In conclusione: 1) FER si presentava elevata alla diagnosi in tutti i pazienti neoplastici; 2) FER raggiungeva picchi significativamente superiori ($P < 0.15$) in pazienti terminali sia per KS che per LPD; 3) FER diminuiva transitoriamente durante il corso della chemioterapia in pazienti responsivi; 4) FER raggiungeva valori elevati in tutti gli stadi delle neoplasie HIV-correlate, e diminuiva significativamente solo nelle LPD in remissione completa o parziale ($P < 0.1$ vs. la diagnosi e $P < 0.05$ vs. il decesso).

DECREASED SERUM MALONDIALDEHYDE IN CHILD-PUGH GRADE A CIRRHOTIC PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Clemente C., Berloco P., *Elba S., *Buongiorno G., D'Attoma B., Di Leo A.

Laboratorio di Biochimica, *Divisione di Gastroenterologia, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis", viale della Resistenza, 70013 Castellana Grotte (BA)

Different studies have shown that malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation marker, was decreased in subjects with cancer. This finding fits the hypothesis suggested by Slater et al. (1) proposing that rapidly dividing cells tend to set an oxidant-antioxidant status favorable to their growth with high levels of antioxidants and low substrates of peroxidability. In fact, it has been demonstrated that levels of vitamin E (α -tocopherol) are increased in tumour patients. The objective of this study was, therefore, to investigate whether the serum concentrations of MDA and vit. E in cirrhotic patients were associated with the presence of hepatocellular carcinoma (HCC).

Methods. In our preliminary study, 8 Child A cirrhotic subjects with HCC and 16 HCC-free Child A cirrhotics, sex- and age-matched, were studied. Serum MDA and vitamin E were evaluated by HPLC using two separate methods. Differences between two groups were determined by Student's t test for unpaired data.

Results. Statistical analysis has shown significant ($p=0.011$) lower serum MDA levels in HCC group ($0.47\mu\text{mol/L}\pm 0.087$, mean \pm SD) compared to cirrhotic group ($0.85\mu\text{mol/L}\pm 0.084$). Serum vitamin E did not differ in two groups, whereas the ratio MDA/vit.E, index of oxidant-antioxidant balance, resulted better in HCC patients compared to the cirrhotic ones ($p=0.032$; 0.034 ± 0.006 and 0.054 ± 0.005 , means \pm SD, respectively).

Conclusion. In our study, we have found decreased serum levels of lipid peroxidation and a better MDA/vit.E ratio in cirrhotic patients with HCC suggesting a change of oxidant-antioxidant balance, associated an enhanced cell proliferation.

References.

1) Icosanoids and Cancer (Thaler et al eds) 1984: 21-24.

MMP-3 5A/6A POLYMORPHISM IN ITALIAN INDIVIDUALS AGED OVER 90 YEARS

¹Liberatoscioli L., ¹Di Gennaro I., ²Rolleri M., ²Bertolini S., ^{1,3}Federici G., ¹Cortese C., ¹Bernardini S., ⁴Motti C.

¹Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Rome, ²Dept. of Internal Medicine, Univ. of Genoa, ³Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome, ⁴Inst. of Biochemistry and Molecular Biology, Univ. of Teramo, Italy

Stromelysin (or MMP-3) is a matrix metalloproteinase implicated in vascular remodelling associated with atherosclerosis. MMP-3 is able to degrade proteoglycans, different types of collagen, laminin, fibronectin, gelatin and elastin; as well, it activates other MMPs. There is a bi-allelic single nucleotide polymorphism in the promoter region of the MMP-3 gene with one allele having a cluster of 5 adenosines (5A) and the other six adenosines (6A). The 5A allele exhibits a higher transcriptional activity than the 6A allele and this seems to cause an enhanced accumulation of extracellular matrix in the presence of 6A allele as a consequence of a defective degradation. In fact, a faster progression towards the development of coronary lesions has been observed in individuals homozygous for the 6A allele. Our study was aimed to calculate the allele and genotype frequencies of this polymorphism in a population of 210 individuals aged over 90 yrs. (109 nonagenarians and 101 centenarians). At the same time we studied also a population of 446 individuals aged under 60 yrs. We have used a rapid method for the genotype analysis of the MMP-3 5A/6A polymorphism based on a PCR amplification with mismatch primers (Gnasso et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000). The following genotype prevalences were obtained: over 90 yrs, 5A5A:0.305, 5A6A:0.486, 6A6A:0.209; under 60 yrs, 5A5A:0.217, 5A6A:0.504, 6A6A:0.278 ($P=0.02$). The corresponding allele prevalences were over 90 yrs, 5A:0.548, 6A:0.452; under 60 yrs, 5A:0.470, 6A:0.530 ($P=0.008$). In individuals with at least one 6A allele the probability of not reaching an age over 90 yrs was significantly higher with an odds ratio of 1.58 (1.07-3.32). These results would suggest that the MMP-3 polymorphism might be responsible for a selective effect, probably because of a more elevated incidence of cardiovascular disease in individuals with the 6A allele.

LA ESCREZIONE DI α_1 MICROGLOBULINA E DI IgG PREDICE OUTCOME E RISPOSTA ALLA TERAPIA NELLA GN MEMBRANOSA

Petrini C.*, Bazzi C.°, Rizza V.*, Arrigo G.°, Pisano L.°, D'Amico G.°

Divisione di Nefrologia e Dialisi° e Laboratorio di Biochimica*, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

La progressione alla insufficienza renale cronica (IRC) in molte glomerulonefriti (GN) primitive è associata alla entità della proteinuria e alla estensione del danno tubulo-interstiziale (DTI). Scopo dello studio è stata la valutazione sia del rapporto tra DTI ed escrezione di singole proteine che la valutazione del valore predittivo della escrezione di proteine di diverso peso molecolare (IgG: PM 150 kD; α_1 microglobulina [α_1 m]: PM 31.8 kD) rispetto all'outcome funzionale in 78 pazienti (pz) con GN membranosa idiopatica (GNM). La proteinuria è stata caratterizzata mediante elettroforesi in gel di acrilamide-SDS e dosaggio immunonefelometrico di singole proteine (albumina, α_1 m), eseguito su un campione urine della seconda minzione del mattino ed espresso in mg per g di creatinina urinaria (mg/g uCr). La escrezione di IgG ($p = 0.0087$) e di α_1 m ($p = 0.0024$) ma non di albumina ($p = 0.37$), di transferrina ($p = 0.38$) né la proteinuria/die ($p = 0.32$), erano significativamente associate al DTI (score 0-1 vs ≥ 2). La escrezione di α_1 m era dipendente da quella di IgG ($r = 0.67$; $p = 0.0001$), ma non da quella di albumina ($p = 0.66$) né dalla proteinuria/die ($p = 0.07$). L'outcome funzionale è stato valutato in 38 pz con sindrome nefrosica (SN) e funzionalità renale basale normale (sCr 0.99 ± 0.20 mg/dl; follow up: 44 ± 22 mesi). La remissione della proteinuria si osservava nel 100% e nel 20% dei pz. con escrezione di IgG $< vs \geq 110$ mg/g uCr ($p = 0.0001$) e nel 77% e 17% dei pz. con escrezione di α_1 m $< vs \geq 33.5$ mg/g uCr ($p = 0.009$). La progressione alla IRC (IRC terminale o raddoppio della sCr) si osservava nello 0% e 35% dei pz. con diversa escrezione di IgG ($p = 0.0026$) e nello 0% e 58% dei pz. con diversa escrezione di α_1 m ($p = 0.0001$). 19 pz non trattati sono stati paragonati e 19 pz. trattati con terapia immunodepressiva: non vi era differenza né per la remissione né per la progressione alla IRC quando la escrezione delle 2 proteine era $<$ cut-off (remissione: IgG: 100%; α_1 m 77%; progressione: IgG: 0%; α_1 m 0%); vi era invece una significativa differenza tra trattati e non trattati, rispetto alla progressione alla IRC, nei pazienti con escrezione di α_1 m \geq cut-off (progressione: 17% vs 100%; $p = 0.0076$). In conclusione la escrezione di IgG è associata alla estensione del DTI e alla escrezione di α_1 m; tale osservazione avvalorava l'ipotesi che le IgG siano la componente tossica della proteinuria. La escrezione di IgG e α_1 m ha un elevato valore predittivo dell'outcome funzionale ed è utile alla identificazione dei pazienti a rischio di progressione, per i quali è indicata una terapia immunodepressiva.

Bazzi C., Petrini C., Rizza V. et al., *Kidney Int.* 58, 1732-1741, 2000

ATTIVAZIONE ENDOTELIALE IN PAZIENTI LES

Bocciarelli A., Tordi A., Ricceri V., Strom R., Ciarla M.V.

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

Sono stati esaminati, in collaborazione con il Dipartimento di Terapia Medica, Divisione di Reumatologia, 65 pazienti affetti da LES, giunti consecutivamente all'osservazione e classificati secondo i criteri definiti nel 1982 dall'American Rheumatology Association (ARA). I pazienti, 6 maschi e 59 femmine, avevano un'età media di 38 anni (*range* 13-65) ed una durata media di malattia di 85 mesi (*range* 2-324). L'attività di malattia al momento del reclutamento è stata valutata sulla base dell'European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM) e del Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI). Non è stata effettuata alcuna selezione riguardo a sesso, età, razza, tipologia del quadro clinico, terapia. Il gruppo di controllo era costituito da 15 individui sani, 3 maschi e 12 femmine con età media di 38,3 anni (*range* 19-59).

Per ciascun paziente e per i soggetti del gruppo di controllo sono stati determinati i seguenti parametri: molecole di adesione solubili sia vascolare (sVCAM-1) che intercellulare (sICAM-1), siero amiloide A (SAA), cistatina C (CysC) e creatinina, i cui risultati sono riassunti nella tabella:

	pazienti (65) media \pm SD	controlli (15) media \pm SD	p
sVCAM-1 ng/mL	475 \pm 244	349 \pm 53	< 0.005
sICAM-1 ng/mL	251 \pm 75	245 \pm 54	ns
SAA mg/L	37.9 \pm 79.5	3.1 \pm 1.6	< 0.001
CysC mg/L	1.28 \pm 0.55	0.76 \pm 0.10	< 0.001
creatinina mg/dL	0.88 \pm 0.22	0.82 \pm 0.13	ns

I pazienti affetti da LES mostrano livelli di sVCAM-1, SAA e CysC significativamente elevati rispetto ai soggetti normali. I valori di sICAM-1 e di creatinina non presentano invece differenze significative tra i due gruppi. Tra i pazienti, 53 su 65 (81%) evidenziano livelli di CysC superiori alla media + 2SD rispetto al gruppo di controllo, mentre la valutazione della funzionalità renale secondo i criteri ARA individua un gruppo di 14 pazienti (21% del totale) con alterazioni renali. L'analisi della regressione lineare mette in evidenza per la CysC, ma non per la creatinina, una correlazione positiva sia con sVCAM-1 ($r=0.51$, $p<0.001$) che con sICAM-1 ($r=0.42$, $p<0.001$). I valori di CysC superiori a 0.96 mg/L (pari alla media + 2SD del gruppo di controllo) si correlano positivamente sia con lo SLEDAI ($r=0.34$, $p<0.02$) che con l'ECLAM ($r=0.30$, $p<0.05$). Non vi sono correlazioni con i livelli di anticorpi antifosfolipidi. Questi risultati suggeriscono che: 1) vi è nei pazienti affetti da LES, correlata all'indice di attività della malattia, un'attivazione delle cellule endoteliali, che a livello glomerulare è evidenziata dall'aumento dei livelli sierici di CysC; 2) l'attivazione dell'endotelio glomerulare è sostenuta prevalentemente da un processo flogistico.

MARCATORI BIOCHIMICI NELLA PROGNOSE DELLO SHOCK

Balduini A., Pezzilli R.^c, Bosoni T., Poma G., Massa M.^a, Marseglia C.^b, Moratti R., Melzi d'Eril G.V.^d, Merlini G.

Lab. Biotecn. e Serv. Anal. Chim. Clin., Dip. di Pediatria^a, Div. di Ematologia^b, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia. Serv. Pronto Socco.^c, Ospedale Sant'Orsola, Bologna. Dip. SBSC^d, Univ. Insubria, Varese.

Lo shock è un'emergenza medica che richiede una diagnosi accurata in tempi brevi per impostare una corretta terapia. Abbiamo analizzato alcuni parametri di danno pancreatico ed epatico (amilasi, lipasi, ALT, AST), di fase acuta (PCR, SAA, IL-6, sVCAM -1) e di infezione invasiva (PCT) in 12 pazienti (3 uomini, 9 donne, età media 79.4) giunti al Pronto Soccorso con diagnosi di shock (pressione sistolica <80 mmHg e pressione venosa < 8 cm H₂O). Le determinazioni sono state eseguite all'arrivo in ospedale e dopo 4, 8, 12 e 24 ore. I livelli di amilasi, lipasi, ALT e AST sono stati determinati su ADVIA (Bayer), PCR e SAA su Nefelometer II (Berhing), IL-6 con ELISA DUO SET System (R&D System), sVCAM-1 con ELISA System (Bender Med System), PCT con LUMItest (Brahms) seguendo le istruzioni del produttore. Sette pazienti morirono durante il ricovero (3 all'accettazione, 3 fra le 4 e le 8 ore dopo il ricovero e 1 dopo le 24 ore). I risultati sono riportati nella Tabella.

	Basale n=12	4 h n=9	8 h n=6	12 h n=6	24 h n=5
Amilasi U/L	255.7 +235	346 +246	321 +278.7	234 +170.1	298 +200.7
Lipasi U/L	24.4 +12.6	35.6 +29.3	24.3 +20.8	31.2 +42.9	23.3 +26.6
AST U/L	202.1 +475	469.3 +1088	149.5 +263	52.2 +35.9	113 +116.2
ALT U/L	91.2 +147	122.3 +297.9	35.3 +42.5	95.8 +169	53.3 +37.2
PCR mg/L	117 +97	144 +135	177 +116	223 +115	197 +83
SAA mg/L	395.7± 460.8	403.7 +424.6	684.3 +671.3	795 +687.4	468.7 +235.1
IL-6 pg/mL	17514 +42897	34511 +61650	2166.5 +2745	1341.4 +1898	5015 +8647
sVCAM-1 ng/mL	1679.9 +574.8	2007.8 +855.9	2160.7 +706	2647.6 +299.4	2444.5 +848
PCT ng/mL	19.9 +40.9	38.3 +60.7	65.1 +84.6	69.8 +90.8	92.6 +24.4

I marcatori pancreatici ed epatici hanno mostrato un danno più severo del fegato rispetto al pancreas senza significativa correlazione con la prognosi. Tutti i marcatori di fase acuta hanno mostrato un "trend" in aumento fra i livelli basali e quelli a 12 ore dal ricovero, senza correlazione con la prognosi, ad eccezione di PCT (livello basale) e di SAA (a 4 ore). In conclusione, solo i livelli di PCT, marcatore di sepsi, e di SAA, marcatore di cattiva prognosi nei pazienti di età avanzata, hanno mostrato correlazione con la prognosi nello shock.

ALCUNI ASPETTI QUALITATIVI DELLA PROTEINURIA PREDICONO L'OUTCOME FUNZIONALE NELLA NEFROPATIA IgA

Petrini C.*, Bazzi C.^o, Rizza V.*, Napodano P.^o, Arrigo G.^o, Orani M.A.^o, D'Amico G.^o

Divisione di Nefrologia e Dialisi^o e Laboratorio di Biochimica*, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

Nella nefropatia a depositi mesangiali di IgA (NIgA) i principali fattori predittivi di progressione alla insufficienza renale cronica (IRC) sono la entità della proteinuria, la ipertensione arteriosa ed alcuni parametri istologici, valutati sulla biopsia renale. Scopo dello studio è stato quello di accertare in 158 pazienti (pz) con NIgA il valore predittivo rispetto all'outcome funzionale di alcuni aspetti qualitativi della proteinuria, in confronto ad alcuni parametri istologici (sclerosi glomerulare globale [SG] ed estensione del danno tubulo-interstiziale [DTI]) valutati semiquantitativamente in 122 pz. La proteinuria è stata caratterizzata mediante elettroforesi in gel di acrilamide-SDS e dosaggio immunonefelometrico di singole proteine (albumina, α_1 microglobulina [α_1 m]), eseguito su un campione urine della seconda minzione del mattino ed espresso in mg per g di creatinina urinaria (mg/g uCr). 52 pazienti avevano una IRC basale (creatininemia [sCr] > 1.4 mg/dl): la presenza di IRC basale era significativamente associata con il DTI (score 0-2 vs 3-6: 9% vs 65%: p = 0.000), con la SG (SG < 10% vs $\geq 11 < 30$ vs ≥ 30 : 4% vs 42% vs 88%: p = 0.000) e con la escrezione di α_1 m (< 14 vs $\geq 14 < 30$ vs ≥ 30 mg/g uCr: 8% vs 59% vs 100%: p = 0.000). L'outcome funzionale è stato valutato in 122 pz (follow up 45 ± 23 mesi). Una remissione completa della proteinuria (< 0.2 g/die) era associata al pattern fisiologico SDS-PAGE (86%: p = 0.001), allo score del DTI (score 0-2 vs 3-6: 40% vs 6%: p = 0.003), alla escrezione di albumina (< 25% vs ≥ 25 mg/g uCr: 82% vs 17%: p = 0.0001), ma non alla sclerosi glomerulare (< 10 vs $\geq 11 < 30$ vs ≥ 30 %) 35% vs 25% vs 10%: p = 0.25). La progressione alla IRC (IRC terminale o raddoppio delle sCr) era associata allo score del DTI (4% vs 43%: p = 0.0001), alla SG (55% vs 25% vs 60%: p = 0.0001) e alla escrezione di α_1 m (7% vs 34% vs 89%: p = 0.0005).

In conclusione nella NIgA alcuni aspetti qualitativi della proteinuria sono significativamente associati alla presenza di IRC basale e hanno un valore predittivo, rispetto sia alla remissione che alla progressione, superiore a quello di alcuni parametri istologici come la estensione del DTI e la SG.

D'Amico G., Am J Kid Dis 36, 227-237, 2000

S-100 β E BY-PASS CARDIOPOLMONARE

Faggian D.*, De Paoli M.*, Tasinato A.*, Bianco R.°, Vendramin I.°, Casarotto A.°, Plebani M.*

*Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

°Dipartimento di Chirurgia Cardiovascolare, Università degli Studi di Padova

OBIETTIVO

Scopo dello studio è stato quello di valutare una possibile correlazione tra il marcatore neurobiochimico di danno cerebrale, la Proteina S-100 β e l'outcome in Pazienti sottoposti ad intervento cardiaco.

MATERIALI E METODI

Abbiamo analizzato la Proteina S-100 β nel siero di 104 Pazienti sottoposti a sostituzione di valvola (N=42) e a by-pass aorto coronarico (N=41 con pompa e N=21 senza pompa) ai seguenti tempi: T1 (24h prima dell'intervento), T2 (prima dell'infusione di eparina), T3 (prima dell'infusione di protamina), T4, T5, T6 (6, 12, 24h dopo l'intervento).

La Proteina S-100 β è stata dosata con un metodo immunometrico automatico non competitivo su strumento Liaison e reattivi della Byk-Sangtec Diagnostica.

RISULTATI

I Pazienti sottoposti a by-pass cardiopolmonare hanno mostrato un incremento dei livelli sierici della proteina S-100 β durante l'intervento chirurgico seguito da un progressivo decremento del valore fino a raggiungere nelle successive 24h i livelli basali. I valori medi più elevati sono stati trovati al tempo T3 in Pazienti sottoposti a chirurgia valvolare (Gruppo A: 5,58 μ g/L) e confrontati con i Pazienti che hanno subito chirurgia coronarica (con pompa Gruppo B: 3,39 μ g/L; senza pompa Gruppo C: 0,57 μ g/L) (Gruppo A vs Gruppo B, $p < 0,05$; Gruppo B vs Gruppo C, $p < 0,05$). Nessuna relazione significativa è stata trovata tra i livelli sierici della Proteina S-100 β e il tempo di by-pass cardiopolmonare o il danno neurologico.

CONCLUSIONI

Il by-pass cardiopolmonare determina un significativo incremento dei livelli sierici della Proteina S-100 β nei Pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca, probabilmente per un transitorio incremento della permeabilità della barriera dovuta ad una indotta risposta infiammatoria. I livelli più elevati trovati nel Gruppo A sono probabilmente correlati con un evento embolico intraoperatorio. Nella nostra esperienza tuttavia non è stato possibile dimostrare un preciso ruolo della proteina S 100 β come marcatore di danno cerebrale dopo intervento cardiaco.

LO STRESS OSSIDATIVO NELLE FAMIGLIE DEI PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 1

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

Dipartimento Medicina Interna, Università di Pisa;

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana - Pisa

Il nesso che lega l'iperglicemia alle complicanze diabetiche rimane sconosciuto. Alla ricerca di una predisposizione familiare al danno ossidativo, abbiamo analizzato gli indici del metabolismo glucidico e lipidico, gli indicatori plasmatici e cellulari di ossidazione lipidica e l'effetto dei radicali dell'ossigeno sugli eritrociti di pazienti con diabete tipo 1 e di loro familiari.

Abbiamo reclutato 30 diabetici tipo 1 (10 senza complicanze, 10 con retinopatia, 10 con nefropatia), 36 fratelli e 37 genitori non diabetici di diabetici tipo 1, 3 gruppi di controllo di soggetti sani senza familiarità per diabete. Abbiamo misurato creatininemia, glicemia, HbA1c, colesterolo, trigliceridi, Lp(a), fibrinogeno, malondialdeide (MDA), ed i prodotti dell'ossidazione proteica (advanced oxidation protein products, AOPP). La risposta degli eritrociti (RBC) allo stress ossidativo (incubazione di 3 ore a 37°C con e senza generatore di radicali) è stata valutata in base al glutatione eritrocitario (RBC GSH), al RBC MDA, ed all'emolisi.

I pazienti diabetici avevano livelli elevati di glicemia ($p < 0.001$), HbA1c ($p < 0.001$), Lp(a) ($p < 0.01$), e fibrinogeno ($p < 0.05$) rispetto ai controlli. I fratelli dei diabetici avevano valori superiori di Lp(a) ($p < 0.001$); i genitori di glicemia ($p < 0.05$) e Lp(a) ($p < 0.01$). Le concentrazioni plasmatiche ed eritrocitarie di MDA erano significativamente elevate nei diabetici e nei loro familiari, rispetto ai controlli. Il RBC GSH basale era ridotto nei diabetici ($p < 0.01$). L'incubazione delle cellule induceva nei diabetici un calo del RBC GSH di grado minore che nei controlli, ed al contrario un aumento significativo dell'emolisi. Nei familiari l'emolisi era maggiore sia basalmente che dopo incubazione. Il livello plasmatico di MDA era associato con glicemia, creatininemia, e fibrinogeno (R 0.5, $p < 0.001$); il RBC MDA con Lp(a), fibrinogeno, ed MDA plasmatico (R 0.6, $p < 0.001$). Il contenuto basale di RBC GSH correlava con glicemia e RBC MDA prodotto (R 0.3, $p < 0.01$).

Il nostro studio dimostra per la prima volta la presenza di anomalie dei marcatori del metabolismo lipidico (Lp(a)), dello stress ossidativo (MDA plasmatico ed eritrocitario), e della fragilità cellulare (emolisi) nei familiari non diabetici di diabetici tipo 1, confermando l'ipotesi che elementi familiari precedano il diabete. Sembra ragionevole supporre che gli stessi marcatori biologici di rischio cardiovascolare possano anche predire la suscettibilità familiare al diabete tipo 1, proprio come sono associati a quella del diabete tipo 2.

ENDOTHELIN-1 RELEASE IN DIALYSED PATIENTS RECEIVING ERYTHROPOIETIN THERAPY

Di Giovannandrea R. (a), Mazzarella V. (b), Tozzo C. (b), Severini G. (a), Caiola S. (a), Splendiani G. (c), Casciani C.U. (b)

(a) Istituto Superiore di Sanità, Lab. Biochimica Clinica, Roma; (b) CNR-Roma; (c) Dipartimento di Chirurgia-Università di Tor Vergata, Roma

Erythropoietin (EPO) therapy in the treatment of dialysed patient is often associated with adverse vascular effects, which are supposed to be related to an unbalance of endothelial factors such as endothelins. In this study, in order to examine the effects exerted at vasculat level by EPO therapy under different routes of administration, plasma endothelin levels were compared in patients receiving EPO either by continuous intravenous administration (CIV), or by intravenous postdialysis administyration (IVPD). The results obtained show a significant difference between the two routes of administration, with a marked increase in endothelin levels and a significant reduction of mean arterial pressure in patients receiving EPO in bolus after dialysis. On the other hand, both endothelin levels and mean arterial pressure remained unchanged during and after dialysis in patients receing EPO by continuous intravenous administration. These results suggest that CIV is a simple and convenient way of EPO administration to dialysed patients, to be preferred to IVPD because of its lack of side effects at the vascular level.

Et-1 and EPO were determinated by immunoenzimatic and radioimmunoassay methods, respectively.

Reference: Carlini R., Dusso A., Obialo C. Recombinant human erythropoietin increase endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney International*. 1993;43:1010-14

APPLICABILITÀ METODOLOGICA E CLINICA DI ANTIGENI FECALI (Hp-SA) NELLA INFEZIONE DA HELICOBACTER PYLORI (H.P.) MEDIANTE RICERCA DI ANTIGENI FECALI (Hp-SA)

Fontana A., Mileti A., Lovero R., Minunno V., Petrelli C., Pansini N.

U.O Patologia Clinica I – Az. Policlinico Consorziale, Bari

Introduzione: Per la diagnosi di infezione da *Helicobacter pylori* si utilizzano metodologie invasive e non invasive. Il gold standard rimane la biopsia gastrica che non sempre è facilmente accettata dal paziente. Attualmente più utilizzati sono test non invasivi che presentano vantaggi derivanti dalla riduzione del numero di endoscopie e conseguente risparmio economico, tale strategia inoltre è più vicina alla compliance del paziente. Scopo del nostro lavoro è stato valutare l'efficienza diagnostica di una metodica non invasiva che consente di identificare gli antigeni di H:P: direttamente nelle feci.

Materiali e metodi: Sono stati esaminati n° 20 campioni di feci provenienti da pazienti afferenti presso il nostro ambulatorio dell'U.O. Patologia Clinica I del Policlinico di Bari già sottoposti a biopsia gastrica e da noi testati per ¹³C urea breath test (UBT) ed Hp-SA. Sono stati considerati positivi per infezione da H.P. pazienti con biopsia positiva. I pazienti inclusi nel nostro studio non erano mai stati sottoposti a terapia eradicante e non avevano effettuato terapia antibiotica, inibitori della pompa protonica ed H₂ antagonisti da almeno 4 mesi. Per l'U.B.T. è stato utilizzato l'analizzatore IRIS Byk Golden Italia che utilizza il principio della spettrofotometria ad infrarosso per la lettura del ¹³C. Per la ricerca del Hp-SA è stato utilizzato una metodica immunoenzimatica di tipo qualitativo per la ricerca di antigeni flagellari e somatici di H.P. nelle feci utilizzando un anticorpo policlonale anti H.P. assorbito su pozzetto (Meridian Diagnostics Europe S.r.l.). Risultati:

	F.P. n°	F.N. n°	V.P. n°	V.N. n°	Sensibilità %
Istologia	0	0	7	13	100
UBT	0	0	7	13	100
Hp-SA	0	2	5	13	71
	Specificità %	Valore predittivo Pos. %	Valore predittivo Neg. %	Efficienza %	
Istologia	100	100	100	100	
UBT	100	100	100	100	
Hp-SA	100	100	86	90	

Conclusioni: Dalla nostra esperienza, condotta su un limitato numero di pazienti, il test Hp-SA si è rivelato un ottimo test di screening in fase diagnostica, in quanto non invasivo, di facile esecuzione e con buona compliance per ogni tipo di paziente e fascia di età. Il test confrontato con l'istologia (gold standard per la diagnosi di H.P.) ha presentato elevata specificità, accettabile sensibilità e buona efficienza diagnostica. I nostri risultati necessitano di ulteriori approfondimenti riguardo la valutazione dell'efficienza diagnostica del test in pazienti sottoposti a terapia eradicante.