

## MARCATORI CARDIACI: CONFRONTO TRA DUE SISTEMI ANALITICI

Carenzi S., Grassini A., Montanelli A.

Dipartimento di Patologia clinica, Ospedale Maggiore di Crema (CR)

**INTRODUZIONE:** La Società Europea di Cardiologia e l'American College of Cardiology, nel luglio del 1999 hanno suggerito una ridefinizione di IMA o più propriamente di "Sindrome coronarica acuta" considerando tale ogni grado di necrosi miocardica causata da un evento ischemico.

**SCOPO DELLO STUDIO:** Confrontare due sistemi analitici ACCESS (ditta Beckam) e DIMENSION RxL (ditta Dade-Behring) dotati di un profilo diagnostico cardiaco composto da CK-MB di massa, Troponina I (TnI) e Mioglobina (Myo) e calcolare il limite decisionale/diagnostico per la TnI secondo le indicazioni del gruppo delle Società Scientifiche di Laboratorio e dell'ANMCO (misura del limite decisionale con CV interserie = 10%).

**MATERIALI E METODI:** La curva del CV interserie in funzione della concentrazione della TnI è stata ottenuta processando 6 pool di plasma eparinato in 40 sedute analitiche su entrambi gli analizzatori per un totale di 240 determinazioni. Per lo studio sono stati reclutati 75 pazienti (età media = 60 anni) giunti in PS con sospetto di IMA. CK-MB, TnI e Myo sono stati dosati su plasma eparinato con metodo in chemiluminescenza (Access) e con metodo immunoenzimatico in fase eterogenea (Dimension) applicando le procedure analitiche suggerite dalle ditte. A posteriori sono state acquisite le diagnosi cliniche formulate dagli specialisti cardiologi su ognuno dei 75 pazienti esaminati.

**RISULTATI:** La correlazione tra i dati ottenuti con i due diversi sistemi analitici è risultata ottima per CK-MB ( $R^2=0.9814$ ) e Myo ( $R^2=0.9852$ ) e più che accettabile per TnI ( $R^2=0.9018$ ). Sono stati accertati 21 casi di IMA sulla base dei quali abbiamo deciso di posizionare il limite decisionale della TnI rispettivamente a 0.3 ng/ml per il Dimension ed a 0.1 ng/ml per l'Access.

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI:** Sulla base di questi limiti decisionali i due sistemi forniscono le seguenti performances diagnostiche riferite alla TnI:

Access	Sensibilità 80%	Specificità 52%
Dimension	Sensibilità 70%	Specificità 70%

Segnaliamo per il sistema Dimension la scelta di un limite decisionale diverso da quanto suggerito dalla ditta produttrice (=0.1) dettata da esigenze di specificità concordate con i colleghi del PS e della Cardiologia. Su 10 pazienti in cui è stata posta diagnosi di angina instabile l'Access in 6 casi ha fornito valori oltre il limite decisionale di 0.1, mentre il Dimension in 4 casi ha fornito valori compresi tra 0.1 e 0.3; questo range viene oggi valutato presso il nostro ospedale come "zona grigia".

**BIBLIOGRAFIA:** Herzog CA; Apple FS: "Cardiac biomarkers in the new millennium." *Semin Dial* 2001 Sep-Oct; 14 (5): 322-3.

## OMOCISTEINEMIA IN TRAPIANTATI DI RENE

Signori D.<sup>1</sup>, Zanon O.<sup>1</sup>, Antonucci F.<sup>2</sup>, Vianello A.<sup>2</sup>, Modena F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, <sup>2</sup>Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Ospedale di Feltre (BL)

**Introduzione:** elevate concentrazioni plasmatiche di omocisteina (Hcy) sono state associate con rischio aumentato di eventi cardiovascolari nella popolazione generale e negli uremici. Nei trapiantati di rene Hcy è con elevata prevalenza persistentemente elevata (1).

**Scopo del lavoro:** identificare i fattori che influenzano l'omocisteinemia in una popolazione a rischio cardiovascolare quale i portatori di trapianto (Tx) di rene. **Materiali e Metodi:** Hcy è stata misurata con metodo PFIA (Abbott Diagnostici) in 25 portatori di trapianto renale, 18 M e 7 F, di età  $48 \pm 12$  (range: 23-67) anni, uremici da  $11 \pm 8$  (2-29) anni, con Tx renale funzionante da  $62 \pm 46$  (2-171) mesi, peso  $65 \pm 13$  (45-90) Kg, 18 in terapia steroidea, 17 CsA, 8 Tacrolimus, 8 Azatioprina, 3 Micofenolato, 9 statine. 11 presentavano colesterolemia  $>200$  mg/dL, 20 ipertesi in terapia, nessuno in supplementazione con acido folico o complesso vitaminico B.

**Risultati:** S-Creatinina (SCr)  $1,7 \pm 0,7$  (0,9-3,4) mg/dL e Creatinina clearance (CICr) calcolata sec. Cockcroft-Gault  $55 \pm 22$  (22-103) mL/min. Hcy  $20,5 \pm 8,7$  (8,6-42,5)  $\mu$ mol/L, 17 trapiantati presentavano valori  $>15$   $\mu$ mol/L; differenze statisticamente significative non si sono rilevate per sesso, terapia immunosoppressiva (uso o no di steroidi, CsA o Tacrolimus) e uso di statine, ma per ipertensione ( $22,3 \pm 8,7$  vs  $13,4 \pm 4$   $\mu$ mol/L,  $p < 0,05$ ). Hcy ha presentato correlazione con SCr ( $r=0,73$ ,  $p < 0,001$ ) e CrCl ( $R=-0,5$ ,  $p < 0,011$ ); tendenzialmente, ma non significativamente, con peso corporeo ( $R=0,29$ ,  $p=0,16$ ) e età ( $r=0,25$ ,  $p=0,23$ ) e nessuna con età uremica e trapiantologica. La regressione logistica valutata per i fattori predittivi SCr, età, età uremica, età di trapianto, colesterolemia, sesso, uso di steroidi, CsA o Tacrolimus, e ipertensione, dimostra valore predittivo per valori normali di Hcy ( $<15$   $\mu$ mol/L) solo per SCr (C.C. Brown 0,80; Hosmer-Lemeshow 0,98).

**Conclusioni:** i livelli ematici di Hcy nei trapiantati di rene sono influenzati dai valori di creatininemia, il cui valore predittivo è probabilmente legato sia alla sua espressione di funzione renale che al suo legame con il peso.

**Bibliografia:**

1. Bostom AG, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH. Power shortage: clinical trials testing the "homocysteine hypothesis" against a background of folic acid-fortified cereal grain flour.

*Ann Intern Med* 2001 Jul 17; 135(2): 133-137.

PREVALENZA DELL' ALLELE PI(A2) DEL RECETTORE GP IIb/IIIa DELLE PIASTRINE IN UNA POPOLAZIONE DI GIOVANI INFARTUATI

\*Archetti S., \*Tassoni F., \*Bani P., °Assanelli D., \*Albertini A.

\*3° Laboratorio/Biotecnologie, A.O. Spedali Civili, Brescia; Cattedra di Chimica, Università degli Studi di Brescia; °Cattedra di Cardiologia, Università degli Studi di Brescia.

*Introduzione*

Le piastrine giocano un ruolo molto importante nel processo di formazione del trombo e l'inibizione dell'aggregazione piastrinica è dovuta ad una marcata riduzione della malattia e alla mortalità associate a sindromi di instabilità coronaria. L'attivazione del recettore glicoproteico piastrinico GP IIa/IIIb legato al fibrinogeno, al fattore di von Willebrand o alla fibronectina rappresenta l'evento finale affinché avvenga l'aggregazione piastrinica. La glicoproteina GP IIa/IIIb è un recettore presente sulla superficie delle piastrine attivate e si ritiene abbia un ruolo molto importante nella patogenesi della sindrome coronarica acuta. In questo studio sono stati indagati soggetti con età inferiore ai 40 anni con infarto miocardio documentato angiograficamente. Il polimorfismo genetico in questione consiste in una sostituzione di una citosina in timida in posizione 1565 nell'esone 2 del gene del recettore GP IIa/IIIb. Lo scopo dell'indagine è quello di valutare come la presenza dell'allele mutato PI(A2) possa essere correlato con il rischio di contrarre infarto miocardio.

*Materiali e Metodi*

I casi sono stati selezionati dal Servizio di Cardiologia Preventiva dell'Azienda Ospedaliera "Spedali Civili" di Brescia - Università degli Studi di Brescia: 98 casi di giovani di età compresa tra i 20 e i 40 anni con infarto miocardio acuto. I controlli sono stati randomizzati nella provincia di Brescia: 150 giovani, sempre di età compresa tra i 20 e i 40 anni, apparentemente sani.

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico; mediante PCR è stata amplificata la sequenza target e, in seguito, i campioni amplificati sono stati sottoposti ad SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e le bande evidenziate su minigel di acrilamide (PhastSystem) con colorazione argentea.

*Risultati*

La prevalenza della mutazione è maggiore nei casi rispetto ai controlli; in particolare il 31% dei casi presentano la mutazione in forma eterozigote rispetto al 18% dei controlli. La mutazione in forma omozigote è presente solo in un caso. La prevalenza dell'allele PIA2 è pari al 17,3% nei casi e al 9% nei controlli.

*Conclusioni*

I nostri dati dimostrano che esiste un'associazione tra il polimorfismo PIA2 della glicoproteina IIIa e l'infarto miocardio nei giovani. Abbiamo studiato una popolazione di persone giovani di età inferiore ai 40 anni dove il ruolo dei parametri genetici gioca un ruolo preponderante rispetto a quelli ambientali che sono tipici dell'età più avanzata.

L. Scaglione et al.: European Journal of clinical Investigation (1998) 28, 385-388.

PROGNOSTIC MARKERS IN CONGESTIVE HEART FAILURE: ROLE OF PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE AND TROPONIN T

Rossi C., Giorgi A\*, Gismant M\*, Fresu R., Gasbarrini G\*, De Sole P.

Institute of Clinical Chemistry; Institute of Internal Medicine\*, Catholic University of Sacred Heart - Rome (Italy)

**BACKGROUND:** several studies suggest that pro-Brain Natriuretic Peptide (pro-BNP) is a sensitive and specific marker for the detection of left ventricular systolic dysfunction (LVEF) in congestive heart failure (CHF), while Troponin T (TnT) is also detected in CHF, but its prognostic value is controversial. **PURPOSE:** to evaluate, whether the combination of a marker for left ventricular overload and a marker for myocardial cell injury would be useful, in patients with CHF, as prognostic factors and in the clinical workup. **PATIENTS AND METHODS:** pro-BNP and TnT serum levels were measured respectively on discharge and during hospitalization, in 52 consecutive patients belonging to NYHA functional class I-II (59%) and III-IV (41%). Patients were monitored for a mean follow-up period of 285 days. TnT was measured by using the Elecsys 2010 System (Roche Diagnostics). Pro-BNP was measured by using a competitive EIA assay (Biomedica; cat no BI-20852). **RESULTS:** standard linear regression analysis showed a strong significant relationship between pro-BNP and TnT ( $p < 0.0001$ ). pro-BNP was associated with NYHA classification ( $p < 0.0001$ ), LVEF ( $p < 0.0001$ ), pulmonary pressure ( $p < 0.0002$ ), hypokinesia ( $p < 0.0492$ ), left ventricular dilatation ( $p < 0.0258$ ), chronic atrial fibrillation ( $p < 0.0001$ ), interstitial edema ( $p < 0.0003$ ) and alveolar edema ( $p < 0.0044$ ), while TnT was related only to chronic atrial fibrillation ( $p < 0.0191$ ) and alveolar edema ( $p < 0.0104$ ). Cardiac death occurred in 16 patients. Pro-BNP ( $= 3000$  pg/ml,  $P < 0.003$ ) and TnT ( $= 0.10$  ng/ml;  $P < 0.015$ ), showed significant relationship with mortality, but pro-BNP was more discriminant than TnT. In a multivariate Cox regression analysis including 35 parameters, only TnT ( $= 0.10$  ng/ml;  $p < 0.008$ ) was an independent predictor of cardiac mortality. **CONCLUSION:** our data suggest that both TnT and pro-BNP, used alone or in combination, are useful prognostic markers in CHF, but only pro-BNP is statistically related to the clinical workup.

PRELIMINARY CLINICAL EVALUATION OF THE ELECSYS proBNP DETERMINATION IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

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

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

Determination of blood concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (proBNP) has been proposed as an aid in the diagnosis of left ventricular dysfunction in suspected heart failure. Recently, Roche Diagnostics developed a precise and rapid method for proBNP determination utilizing the electrochemiluminescence technology on the Elecsys system, offering the first real possibility for an automated proBNP measurement in clinical practice. In this study, we utilized this novel assay to evaluate the possible use of this marker as an outlook predictor in patients with acute myocardial infarction (AMI). Serum samples were first obtained from 29 healthy individuals (mean age, 56 years; range 50-76). There was a gender difference in proBNP values, male: 47 (13-130) vs. female: 97 (36-178) pg/mL,  $P=0.0038$ , and a positive correlation to age ( $r=0.54$ ,  $P=0.002$ ). Measurements of proBNP were then performed in serum samples collected 48 h after admission in 57 patients with AMI but without clinical evidence of congestive heart failure (median time after symptom onset to admission: 4 h, range 0.5-41). proBNP were markedly increased in these patients compared with normal controls ( $1608 \pm 1800$  vs.  $71 \pm 49$  pg/mL,  $P < 0.0001$ ). Concentrations of proBNP were not related to LV ejection fraction measured both early (first week) and late (2-3 months) after AMI ( $r=-0.23$ ,  $P=0.08$ ; and  $r=-0.10$ ,  $P=0.50$ , respectively). Clinical events including death, unstable angina, and recurrent AMI were recorded for 13 months (median, range 4-23) in 50 patients of this group. During the follow-up, 4 deaths and 11 unstable ischemic syndrome events occurred, giving cumulative event rates of 8% and 22%, respectively. The prognostic information obtained from proBNP was integrated with that obtained from cardiac troponin T (cTnT) measured in the same samples. ROC analyses provided the optimal values of two markers for prediction of death and cardiac events. For prediction of death, a post-IMA proBNP  $>1622$  pg/mL had sensitivity, specificity, and likelihood ratio for positive values of 75%, 76%, and 3.1, respectively. Corresponding values for cTnT ( $>4.40$   $\mu\text{g/L}$ ) were 50%, 91%, and 5.6. In particular, only one death occurred in a patient with a proBNP  $<1622$  pg/mL (Kaplan-Meier survival analysis,  $P=0.04$ ). Notably, nonfatal ischemic events over follow-up were not predicted by proBNP (area under ROC curve, 0.54), reflecting the weakness of possible association of ventricular remodeling and the unstable coronary plaque and subsequent thrombosis.

MISURA DELL'ESPRESSIONE DELL'mRNA DELL'ONCOGENE HER-2 neu NEL TESSUTO E NEL SANGUE DI PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA

Salvadori B., Pinzani P., Casella D., Orlando C., Pazzagli M.

Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze; 'Sezione di Clinica Chirurgica Generale ed Oncologica, Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica, Università di Firenze

L'oncogene HER-2 neu codifica per un recettore transmembranario con attività tirosin-chinasi e con altissima omologia al recettore dell'Epidermal Growth Factor. La glicoproteina intatta ha un peso molecolare di 185 kDa; esiste inoltre una forma troncata circolante (solo la porzione extracellulare del recettore) di 105 kDa. L'amplificazione di HER-2 neu è stata trovata nel 20-30% dei tumori della mammella ed è associata ad una cattiva prognosi. La proteina p185 è overespressa nel 20-35% dei tumori della mammella. Il 5-15% delle pazienti con tumore primario hanno elevati livelli nel siero della p105 mentre questo numero sale al 50-70% nelle pazienti con metastasi. E' noto inoltre che cellule tumorali circolanti si possono trovare nel torrente sanguigno ad uno stadio precoce nel carcinoma della mammella; lo studio di queste cellule potrebbe costituire un importante fattore prognostico ed un parametro importante per monitorizzare la progressione tumorale sia nel follow-up sia nella valutazione della risposta al trattamento nelle pazienti con metastasi. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'espressione dell'mRNA di HER-2 neu nel carcinoma della mammella e nel sangue periferico delle stesse pazienti. La quantità di mRNA del gene bersaglio è stata valutata mediante tecniche di RT-PCR quantitativa con metodo TaqMan, utilizzando una curva standard generata con RNA estratto da una linea cellulare di carcinoma mammario umano (SKBR3). I risultati sono stati espressi come pg equivalenti di RNA di SKBR3/ $\mu\text{g}$  RNA totale. I livelli dell'mRNA di HER-2 neu misurati in 33 carcinomi della mammella e nei corrispondenti tessuti non tumorali adiacenti alla neoplasia sono risultati più elevati nei tumori rispetto ai tessuti sani di controllo ( $2131.98 \pm 2103.76$ ,  $513.69 \pm 944.74$ ,  $p < 0.001$ ). Inoltre i valori trovati nei tumori correlavano significativamente ( $r=0.4927$ ,  $p=0.02$ ) con quelli dei corrispondenti tessuti di controllo. Negli stessi soggetti la ricerca di cellule tumorali circolanti è stata eseguita nel sangue periferico, prima e dopo l'intervento, tramite la determinazione dell'mRNA per HER-2 neu, e contemporaneamente abbiamo valutato la concentrazione della proteina circolante p105 mediante metodo immunoenzimatico (ELISA) nel siero delle pazienti. I livelli di mRNA di HER-2 neu circolante diminuivano in maniera significativa ( $p=0.01$ ) dopo 24 ore dall'intervento chirurgico ( $249.76 \pm 293.9$  vs  $111.53 \pm 126.03$  rispettivamente) in modo analogo a quanto osservato per la proteina circolante ( $8.37 \pm 1.45$  vs  $7.42 \pm 1.16$  rispettivamente,  $p < 0.001$ ). Questa diminuzione dell'mRNA appariva più evidente nelle pazienti con tumori che presentavano livelli di espressione di HER-2 neu mRNA superiori al valore soglia di 1787 (mediana dei valori ottenuti nel tumore). Inoltre, solo nei casi con valore elevato di espressione di HER-2 neu mRNA nel tumore rispetto al corrispondente tessuto sano si aveva una differenza significativa fra i livelli pre e post-intervento della proteina p105 ( $p=0.005$  vs  $p=0.222$ ). La diminuzione dei livelli di mRNA nel sangue conseguente all'intervento chirurgico risultava significativa ( $p=0.02$ ) solo nelle pazienti senza coinvolgimento linfonodale (da  $260.36 \pm 254.14$  a  $84.96 \pm 66.77$ ,  $n=16$ ), mentre nelle pazienti N+ ( $n=11$ ) tale diminuzione (da  $276.19 \pm 365.23$  a  $162.66 \pm 180.72$ ) non risultava significativa ( $p=0.283$ ). Questo dato sembra indicare che esista, nelle pazienti linfonodo-positivo, un'origine di mRNA circolante per HER-2 neu non riconducibile alla sola lesione primaria ma anche di linfonodi metastatici. I nostri risultati sembrano quindi evidenziare l'importanza della determinazione quantitativa dell'espressione dell'mRNA per HER-2 neu nel tessuto e nel sangue di pazienti con carcinoma della mammella. La misura contemporanea di mRNA e proteina, da effettuare su sangue e quindi non invasiva per il paziente, potrebbe fornire importanti informazioni sulla prognosi e il decorso della malattia neoplastica.

CONFRONTO FRA DUE METODI DI DOSAGGIO DELLA TIREOGLOBULINA (Tg) NEL CARCINOMA DIFFERENZIATO DELLA TIROIDE (DTC)

Biancolini D., Seregini E., Ferrari L., Martinetti A., Aliberti G., Ballabio G., Pallotti F., Coliva A., Chiesa C., Bombardieri E.

Unità Operativa di Medicina Nucleare, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, via Venezian 1, 20133 Milano

**Introduzione.** Il dosaggio della Tg sierica rappresenta uno strumento di importanza primaria nel monitoraggio dei pazienti con DTC.

**Scopo dello studio.** Determinare l'accuratezza analitica e diagnostica di due test IRMA per il dosaggio della Tg in pazienti con DTC.

**Pazienti.** Sono stati studiati 157 pazienti con diagnosi istologica di DTC. 89 pazienti sono stati valutati in terapia soppressiva con l-tiroxina (gruppo L-T4 on) e 68 in assenza di terapia soppressiva (gruppo L-T4 off).

**Metodi.** I metodi utilizzati per il dosaggio della Tg sierica sono stati i saggi immunoradiometrici HTGK (DiaSorin, Vercelli) e Dynotest Tg-Plus (Brahms Diagnostica, Germania).

**Risultati.** Le principali caratteristiche analitiche rilevate nel nostro laboratorio per i due saggi sono riportate nella seguente tabella.

Saggio	Sensibilità analitica	C.V.	
		Intrasaggio	Intersaggio
HTGK	0.8 ng/mL	3%	6%
Dynotest	0.08 ng/mL	5%	6%

\*C.V., coefficienti di variazione

La correlazione ( $r^2$ ) tra i due saggi è 0.93 (l'equazione della retta di correlazione, calcolata secondo Passing-Bablok, è  $y=0.44x$ ). I valori di soglia per i due saggi nei pazienti in terapia soppressiva o meno sono stati calcolati tramite l'analisi receiver operator characteristics (ROC) e sono riportati in tabella.

Saggio	Trattamento	Cutoff ng/mL	Accuratezza	AUC
			%	
HTGK	L-T4 off	1	77	0.79
	L-T4 on	1	86	0.87
Dynotest	L-T4 off	0.5	77	0.80
	L-T4 on	0.5	86	0.87

\*AUC, area under curve

**Conclusioni.** I due saggi presentano una medesima accuratezza diagnostica ed analitica, anche se dall'analisi ROC si evince che è necessario modificare i valori soglia per il Dynotest Tg-Plus poichè misura valori di Tg minori rispetto a quelli del saggio HTGK. Questo può essere spiegato dal fatto che i due metodi sono calibrati su valori diversi del medesimo standard CRM 457.

PSALIBERO O COMPLESSATO: CONFRONTO TRALE DUE MISURE

Scapellato L., Franzini C.

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Cliniche "L.Sacco", Milano

Nello screening del carcinoma prostatico (CP) i valori di Antigene Prostatico Specifico totale (tPSA) del siero nell'intervallo 4-10 ng/mL sono considerati come "zona grigia". Per aumentare la efficacia dell'esame, si aggiunge la misura della frazione libera (fPSA), espressa come rapporto libero/ totale (f/t) e con 0,20 come valore discriminante. Alternativamente si ricorre alla misura della porzione complessata con  $\alpha$ -1-anti-chimotripsina (cPSA). In vista dell'incertezza sulla scelta del migliore approccio, abbiamo confrontato le due misure su un gruppo di 298 sieri, selezionati indipendentemente dalla diagnosi clinica, comprendenti valori di tPSA compresi tra 2,04 e 25,9 ng/mL di tPSA e una porzione elevata (206 pari al 69%) di sieri di zona grigia. In tale gruppo-campione si è misurato tPSA, fPSA e cPSA con immunometodo chemiluminescente su strumento Advia Centaur (Bayer), con reattivi e calibratori forniti dalla medesima ditta. I valori di tPSA (y) calcolati [come somma (fPSA+cPSA)] sono risultati assai bene correlati con i valori di tPSA misurati (x), sia sul totale del gruppo ( $y=0,33+0,97x$ ;  $r=0,994$ ;  $n=298$ ) sia nei campioni di zona grigia ( $y=0,24+0,99x$ ;  $r=0,974$ ;  $n=206$ ). Nell'ambito del gruppo-campione dei 206 sieri di zona grigia si è confrontato il valore del rapporto f/t (y) calcolato [come (tPSA-cPSA)/tPSA] con quello del rapporto f/t misurato (x) con i seguenti risultati statistici:  $y=0,02+0,81x$ ;  $r=0,87$ ;  $n=206$ ). In questo confronto, prendendo come valore discriminante  $f/t=0,20$ , 82% dei singoli valori si sono posizionati nei due quadranti della equivalenza ( $<0,20/ <0,20$ : 34%;  $\geq 0,20/\geq 0,20$ : 48%), 18% dei singoli valori nei due quadranti della discordanza. Identica correlazione (anche se inversa) si è osservata confrontando i rapporti c/ t ed f/t, entrambi misurati. Concentrazione di cPSA espressa in ng/mL (y) e rapporto f/t misurato (x) sono invece risultati scarsamente correlati ( $y=6,59-5,98x$ ;  $r=0,514$ ;  $n=206$ ). I dati confermano la "equimolarità" dei metodi e la sostanziale equivalenza delle misure di fPSA e cPSA espresse come rapporto rispetto a tPSA. La distribuzione di frequenza del rapporto f/t ha mostrato una elevata incidenza di valori prossimi al valore soglia (0,20). Piccole variazioni del valore misurato comportano quindi lo spostamento di una significativa porzione di valori da "positivi" a "negativi" e viceversa, giustificando la discordanza osservata nel 18% dei casi. La espressione di cPSA come concentrazione (anzichè come rapporto) sembra invece riconoscere differenti popolazioni di campioni nell'ambito della zona grigia, come riportato in letteratura (Bunting PS. Clin Chim Acta 2002;315:71-97), contribuendo possibilmente a migliorare la efficacia diagnostica della misura del PSA.

## LIVELLI SIERICI DI S-100 NEL FOLLOW-UP DEL MELANOMA CUTANEO CON ANALIZZATORE AUTOMATICO LIAISON

Scribano D., Forni F., Zappacosta B., Diociaiuti A\*, Guidi B.\*, Capizzi R.\*, Amerio PL.\*, Giardina B.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Istituto di Dermatologia\* - Policlinico A. Gemelli - UCSC - Roma

Tra le diverse applicazioni cliniche della proteina S-100 figura anche il suo ruolo quale marker di melanoma cutaneo. Scopo di questo studio è evidenziare, se presente, una correlazione tra livelli ematici di S-100 e stadio di malattia e, come diretta conseguenza di ciò, valutare un suo possibile impiego predittivo della comparsa di metastasi.

Pazienti e metodi: 62 pazienti (32 maschi, 30 femmine, età media:  $55 \pm 33$ ) affetti da melanoma cutaneo diagnosticato istologicamente e classificato in base ai criteri TNM, sono stati sottoposti al dosaggio dell'S-100 al momento della diagnosi; a 38 di questi (18 maschi, 20 femmine) sono stati eseguiti ulteriori dosaggi a 6-12-18 mesi dalla rimozione chirurgica del tumore primitivo. 45 soggetti (20 maschi, 25 femmine, età media:  $51 \pm 32$ ) apparentemente sani sono stati arruolati come gruppo di controllo.

La proteina S-100 è stata dosata in chemiluminescenza con metodo Sangtec-100 su analizzatore automatico Liaison (Byk Gulden Italia). Il cut-off utilizzato è stato di 0,20 ng/g/l. I risultati di S-100 ottenuti nei pazienti al primo e secondo stadio di malattia non appaiono significativamente diversi da quelli ottenuti nel gruppo di controllo ( $p=0.1$ ), rendendo tale marcatore non idoneo per la diagnosi precoce di melanoma. I valori di S-100 si dimostrano significativamente più alti rispetto ai controlli ( $p<0.001$ ) negli stadi III e IV di malattia.

In conclusione tali risultati confermano la significatività dell'S-100 nel follow-up del melanoma. Inoltre l'utilizzo del sistema automatizzato Liaison ha consentito una gestione in tempo reale dei risultati, con una più efficace programmazione temporale degli accertamenti diagnostici necessari.

## CARCINOMI DEL COLON: REAL-TIME PCR PER HTERT, TANKIRASI E MISURA QUANTITATIVA DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA

Poggesi M., Gelmini S., Casini Raggi C., Pazzagli M., Orlando C.

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Firenze

Negli eucarioti la maggior parte del materiale genetico è contenuta nel nucleo dove il DNA è complessato con proteine e organizzato in strutture lineari dette cromosomi. Le estremità cromosomiche, telomeri, contengono sequenze ripetute in tandem di DNA non codificante fino a 15 kb (5' TTAGGG 3' nell'uomo). I telomeri stabilizzano i cromosomi e prevengono la degradazione del DNA che si verifica per l'accorciamento progressivo delle estremità cromosomiche ad ogni ciclo di replicazione cellulare. Il raggiungimento di una lunghezza telomerica critica, induce il blocco della replicazione che può essere superato mediante l'attivazione di meccanismi che permettono la stabilizzazione cromosomica quali la telomerasi. La telomerasi è una RNP costituita da tre subunità. I geni che codificano per queste componenti sono: a) **hTR** (human Telomerase RNA Component) che codifica per il primer a RNA. b) **hTERT** (human Telomerase Reverse Transcriptase) che codifica per la subunità catalitica dell'enzima. c) **TPI** (telomerase-associated protein 1) che sembra essere richiesto in vivo per il completo assemblaggio, funzionalità e regolazione della telomerasi ma che non può essere utilizzato come indicatore dell'attivazione di questo enzima. Questo complesso ribonucleoproteico catalizza l'addizione di ripetizioni esanucleotidiche all'estremità 3' del DNA cromosomico prevenendo la perdita di sequenze telomeriche e contribuendo a mantenere l'immortalità cellulare e la crescita incontrollata delle cellule, meccanismi che sono alla base della trasformazione neoplastica e del mantenimento del fenotipo tumorale. Per la frequenza con cui risulta attivata nei tumori, 85-90%, l'attività telomerica (TA) sembra essere un marker promettente nella diagnosi e nella terapia dei tumori umani. Nel nostro studio abbiamo quantificato l'attività di questa ribonucleoproteina in 106 campioni di colon (53 campioni di tessuto tumorale e rispettivi campioni di mucosa sana) con metodica TRAP (telomeric repeat amplification protocol) modificata mediante l'impiego di un fluorocromo specifico per il DNA a doppia elica, il PicoGreen (S. Gelmini et al., 1998). I valori della TA nei carcinomi (media  $\pm$  SE:  $180.6 \pm 19.0$  ng DNA/ $\mu$ g proteine) risultano significativamente più elevati ( $p=0.001$ ) rispetto ai corrispondenti campioni di mucosa sana (media  $\pm$  SE:  $127.6 \pm 15.06$ ). La TA risulta inoltre positivamente correlata fra i due gruppi di campioni ( $r=0.58$ ,  $p<0.0001$ ). Abbiamo valutato inoltre l'espressione dell'mRNA della subunità catalitica della telomerasi (hTERT) con "Real-Time" PCR mediante sistema TaqMan<sup>TM</sup>. Anche in questo caso, la media dei valori relativi alla misura dell'mRNA di hTERT nei carcinomi (media  $\pm$  SE:  $2606.6 \pm 629.7$  fg RNA HT1080/ $\mu$ g RNA totale) risulta significativamente più elevata ( $p=0.023$ ) rispetto a quella relativa ai campioni di mucosa sana ( $1367.7 \pm 343.6$ ). L'mRNA di hTERT risulta correlato nei campioni tumorali con i valori dei campioni normali corrispondenti ( $r=0.52$ ,  $p<0.0001$ ). Siamo inoltre andati a valutare mediante "Real-Time" PCR con tecnologia TaqMan<sup>TM</sup> l'mRNA del gene della **Tankirasi**, una nuova proteina telomerica che presenta omologia con le anchirine e con il dominio catalitico della poly(ADP-ribosio) polimerasi (PARP). Nell'uomo questo enzima è stato dimostrato essere un regolatore positivo della lunghezza telomerica mediante l'interazione con TRF1, una proteina che lega il DNA telomerico e che funziona da regolatore negativo della lunghezza dei telomeri: una overespressione di questa proteina nel nucleo promuove l'elongazione telomerica. Abbiamo valutato l'espressione genica della Tankirasi negli stessi campioni nei quali avevamo valutato l'espressione dell'mRNA di hTERT e la misura della TA. Dai dati ottenuti, la media dei livelli di espressione della Tankirasi nel tessuto tumorale (media  $\pm$  SE:  $103408.2 \pm 21522.4$  pg DU145/ $\mu$ g RNA totale) risulta significativamente ( $p=0.013$ ) più elevata di quella nel tessuto sano (media  $\pm$  SE:  $55106.279 \pm 8562.1$ ). I livelli di espressione di questo enzima nel tessuto sano e nel tessuto tumorale risultano positivamente correlati ( $r=0.478$ ,  $p<0.0001$ ). Risulta inoltre positivamente correlata nei tessuti tumorali l'espressione di Tankirasi e hTERT ( $p=0.039$ ), mentre TA e hTERT, TA e Tankirasi non mostrano alcuna correlazione. I nostri dati dimostrano che a livello del tessuto tumorale vi è una up-regolazione trascrizionale e funzionale di questi geni coinvolti nel mantenimento della lunghezza dei telomeri.

## VANTAGGI DEL DOSAGGIO DEL PSA COMPLESSATO RISPETTO AL DOSAGGIO DEL PSA LIBERO

Righetti F., Platè L., Zannarini L., Ramazzotti E., Capelli M.

Azienda Ospedaliera di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Laboratorio Centralizzato, Struttura Complessa di Immunometria

### INTRODUZIONE

L'impiego del dosaggio del PSA (Prostatic Specific Antigen) libero per l'identificazione precoce del cancro della prostata ha evidenziato dei limiti per l'instabilità e variabilità della molecola che si riflettono negativamente sull'affidabilità del rapporto tra PSA libero (fPSA) e PSA totale (tPSA). Considerando che l'antigene prostatico specifico circola nel torrente ematico sia in forma complessata (cPSA) sia in forma libera (fPSA), si è voluto valutare la stabilità e la performance del dosaggio del cPSA rispetto al fPSA.

### MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 244 campioni di siero di pazienti ospedalizzati, su cui sono stati saggiati PSA totale e PSA libero con lo strumento Kryptor System e PSA totale e PSA complessato sullo strumento Bayer Advia Centaur. I test sono stati eseguiti in singolo, durante 13 giorni lavorativi; l'elaborazione dei dati è stata fatta utilizzando la regressione lineare. Sono stati inoltre valutati, 2 volte al giorno per 10 giorni, 6 campioni di siero con livelli di concentrazione crescenti, distribuiti lungo tutto il range di estensione della curva di linearità; i risultati sono stati elaborati con il metodo ANOVA. Il sistema Bayer Advia Centaur è stato monitorato tramite campioni di controllo a 3 differenti livelli di concentrazione per il cPSA e a 2 livelli per il tPSA. Infine per saggiare la stabilità e la variabilità del cPSA sono stati testati 3 campioni conservati a 4°C a cinque tempi consecutivi: 0, 5h, 24h, 48h, 96h.

### RISULTATI

Dall'elaborazione statistica dei nostri dati abbiamo rilevato:

- 1) una buona correlazione fra tPSA Centaur e tPSA Kriptor;
- 2) equivalenza fra fPSA Kryptor e fPSA calcolato (= tPSA-cPSA Bayer);
- 3) rapporto fPSA/tPSA Kryptor uguale al rapporto fPSA calcolato/ tPSA Bayer;
- 4) un buon profilo di imprecisione del tPSA e cPSA Bayer;
- 5) una buona stabilità del cPSA.

### CONCLUSIONI

La valutazione dei dati ottenuti ha evidenziato come il dosaggio del PSA complessato, marcatore diagnostico precoce del cancro della prostata, sia più affidabile dal punto di vista analitico rispetto al dosaggio del PSA libero, in quanto la molecola complessata risulta essere più stabile e la sua concentrazione sierica meno influenzabile dalle normali procedure di trattamento e conservazione dei campioni.

## LIVELLI INTRACAVITARI E PLASMATICI DI VEGF, bFGF, IL-8 ED IL-12 NEI GLIOMI MALIGNI.

Salmaggi A., Eoli M., Frigerio S., Silvani A., Gelati M., Corsini E., Boiardi A., Bernardi G.

IRCCS Istituto Nazionale Neurologico "C.Besta", via Celoria n.11 20133 MILANO

La crescita e l'invasività dei tumori gliali maligni è strettamente dipendente dai processi di angiogenesi, infatti una notevole proliferazione dei microvasi è caratteristica istologica dei gliomi di alto grado e la densità dei microvasi è considerata un indicatore prognostico. Recentemente Stockhammer e colleghi hanno misurato VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nei liquidi cistici di pazienti con tumori cerebrali primari e secondari ed hanno trovato che i livelli più elevati sono presenti nei glioblastomi recidivanti (1). Inoltre sono stati trovati livelli più elevati di bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) nel liquor di bambini con tumori cerebrali rispetto a quelli presenti in altre patologie. Si ritiene che nella crescita e nell'aumentata angiogenesi dei gliomi maligni siano coinvolti anche IL-8 (Interleuchina 8) con effetti di stimolo e IL-12 (Interleuchina 12) con effetti inibitori.

I livelli di VEGF, bFGF, IL-8 e IL-12 sono stati misurati nei liquidi endocavitari (aspirati da cavità post-chirurgiche) di 45 pazienti: 7 astrocitomi anaplastici recidivanti (rAA), 12 glioblastomi (GBM) e 26 glioblastomi recidivanti (rGBM). In 25 pazienti (13 rGBM, 8GBM, 4rAA) sono stati misurati anche i livelli plasmatici e confrontati coi valori di 23 controlli sani.

Sono stati utilizzati kit ELISA del commercio: VEGF e bFGF: R & D Systems, Minneapolis, USA. IL-8 e IL-12: BioSource Europe S.A. Nivelles Belgium.

I dati dei vari gruppi di pazienti sono stati confrontati con test non parametrici (Mann-Whitney U test) e per le correlazioni tra livelli plasmatici ed endocavitari è stato usato il coefficiente di correlazione di Spearman.

I livelli più alti di VEGF furono trovati nei pazienti con rGBM, livelli intermedi in quelli con GBM (rGBM vs GBM  $p=0.01$  rGBM vs rAA  $p=0.02$ ). Livelli più alti di IL-12 furono trovati in pz. GMB che in rAA ( $p=0.02$ ).

Livelli plasmatici di bFGF e VEGF furono trovati più alti nei pazienti che nei controlli ( $p=0.001$  e  $p=0.04$ ) mentre i livelli di IL-12 più bassi ( $p=0.009$ ).

I livelli intracavitari di VEGF e IL-8 furono trovati più alti dei corrispondenti livelli plasmatici, ma senza una chiara correlazione nei singoli casi individuali.

I nostri dati confermano il ruolo dell'angiogenesi nello sviluppo e nella progressione dei tumori maligni e suggeriscono che i livelli plasmatici delle molecole indagate possano essere utili nella diagnosi e nel monitoraggio di queste malattie.

1. Stockhammer G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in brain tumor cysts and correlates with tumor progression. *Acta Neuropathol* 2000 100(1):101-105.

## MODULAZIONE DI BIOMARCATORI E FATTORI ANGIOGENICI IN CORSO DI TERAPIA NEOADIUVANTE PER I CARCINOMI DEL RETTO

Ferrari L., Seregini E., Martinetti A., Biancolini D., Cortinovis D., Di Bartolomeo M., Beretta E., Ferrario E., Pallotti F., Coliva A., Bajetta E., Bombardieri E.

Unità di Medicina Nucleare ed Oncologia Medica B, Istituto Nazionale Tumori, via Venezian 1, 20133 Milano

**Introduzione.** Il vascular endothelial growth factor (VEGF) controlla l'angiogenesi tumore-indotta ed ha un valore prognostico nei tumori gastrointestinali. L'antigene carcinoembrionale (CEA) e l'antigene carboidratico CA 19.9 sono i marcatori correntemente usati nella sorveglianza dei tumori coloretali. Tuttavia non esistono dati relativi alla valutazione di questi marcatori in corso di trattamento primario. **Scopo dello studio.** Studiare i livelli sierici di VEGF, CEA e CA 19.9 in pazienti con carcinoma rettale sottoposti a chemio- radioterapia neoadiuvante. **Pazienti.** Sono stati studiati 13 uomini (età mediana 59 anni, range 30-84) e 7 donne (età mediana 60 anni, range 30-69) con tumori del retto operabili. **Metodi.** Il VEGF (R&D Systems, USA) è stato misurato con metodo immunoenzimatico ed i marcatori tumorali CEA (Radim, Italia) e CA 19.9 (Cis, Francia) con metodo immunoradiometrico, prima e dopo il trattamento combinato. **Risultati.** I valori mediani di tutti i biomarcatori studiati tendono a diminuire durante il corso del trattamento, tuttavia soltanto il decremento del CEA è statisticamente significativo (Wilcoxon's signed rank test,  $p=0.012$ ). L'analisi di correlazione eseguita ha dimostrato che i livelli di CEA e di CA 19.9 pretrattamento correlano tra loro (Pearson's correlation,  $p>0.0001$ ), così come i livelli pretrattamento di CA 19.9 con la situazione clinica dopo la terapia neoadiuvante ( $p=0.024$ ). La relazione tra CA 19.9 e risposta alla terapia è stata confermata anche dalla significatività della correlazione tra variazione percentuale dei livelli di CA 19.9 pre- e post-trattamento e grado di regressione tumorale ( $p=0.027$ ). Il grado di regressione tumorale è stato stimato dal patologo valutando il rapporto tra fibrosi e tessuto non fibrotico presente nel pezzo chirurgico. Infine i livelli post-trattamento di CEA correlano significativamente con il downstaging ( $p=0.012$ ). Si è considerato downstaging l'assegnazione di un paziente ad uno stadio patologico (basato sul pTNM) minore rispetto a quello valutato alla diagnosi sul TNM clinico. **Conclusioni.** I marcatori tumorali CEA e CA 19.9 confermano il loro valore nel carcinoma del retto. Il CA 19.9 pretrattamento sembra essere in relazione con il successo della terapia neoadiuvante ed i livelli di CEA post-trattamento sembrano essere utili per l'identificazione dei pazienti in cui si verifica un downstaging. La valutazione del VEGF, nel trattamento primario studiato, non sembra fornire informazioni aggiuntive rispetto a quelle ottenibili misurando CEA e CA 19.9.

## VALUTAZIONE DEL TEST cPSA E DELLA EQUIVALENZA ANALITICA TRA VALORI DI fPSA E (tPSA - cPSA)

Franchini E., Scaggiante F., Ogriseg M.

Laboratorio Patologia Clinica  
Azienda Sanitaria - Ospedale Bressanone

L'antigene prostatico specifico (PSA) circola nel torrente ematico sia come PSA complessato (cPSA) sia come PSA libero (fPSA). È noto da tempo che il cPSA è la forma principale del PSA e aumenta all'aumentare dei livelli di PSA (Stenman U., 1991). I pazienti con carcinoma della prostata hanno una percentuale superiore di cPSA rispetto ai pazienti con IPB.

Obiettivo del lavoro è valutare l'affidabilità ed i vantaggi analitici del dosaggio sierico del cPSA sul sistema ADVIA Centaur Bayer. In questo studio sono stati presi in considerazione 68 sieri di pazienti maschi sani, con patologie prostatiche benigne o carcinoma prostatico ed i valori di PSA totale erano compresi tra 2.4 e 13.3 ng/ml. Su ogni siero sono stati determinati il PSA totale, fPSA e cPSA con reagenti Bayer su ADVIA Centaur, sistema completamente automatico per dosaggi immunologici in chemiluminescenza. Sono stati calcolati inoltre il rapporto PSA libero/PSA totale (f/t) ed il rapporto (tPSA-cPSA)/PSA totale.

Come dimostrato anche da altri studi (Croal BL., 2000), dal confronto dei due rapporti si può mettere in evidenza una paragonabile performance clinica. Tra i vantaggi analitici si riscontra una precisione migliore ed una stabilità maggiore del cPSA vs il fPSA.

## ERB2-NEU NUOVO BIOMARCATORE PER IL TUMORE DELLA MAMMELLA

Nubile G., Gaetani V., Carosella R., Tucci E., Savini F., Caporaletti P.

Laboratorio Analisi, P.O. Ortona, ASL di Chieti

### Introduzione:

Nel maggio del 2001 il Laboratorio, in collaborazione con il reparto di Senologia chirurgica e con la Bayer Settore Diagnostici, ha predisposto uno studio clinico per le neoplasie del seno. Lo studio prevede i seguenti step: reclutamento pazienti su base di accertamento di visita chirurgica con annessi valutazioni strumentali; esecuzione prelievo ematico pre e post intervento chirurgico, esecuzione prelievo a distanza di tre mesi prescrizione di terapie no chirurgiche.

### Scopo dello studio:

Verifica dell'affidabilità diagnostica di un innovativo biomarcatore oncologico: l'erb-2/neu con Microtiter ELISA, con particolare attenzione al follow-up ed al monitoraggio delle pazienti con neoplasie al seno.

Sono state reclutate 70 pazienti e quaranta soggetti sani, tra i 23 ed 82 anni, 10 soggetti reclutati con diagnosi con diagnosi di carcinoma duttale infiltrante (CDI), 10 soggetti con diagnosi di carcinoma lobulare infiltrante (CLI), 10 con diagnosi di carcinoma duttale in situ (CDIS), 10 con carcinoma lobulare in situ (CLIS), 10 con carcinoma duttulo lobulare (CDL), 10 con carcinoma midollare (CM), 10 con carcinoma tubulare (CT).

### Materiali e metodi:

Gli esami sono stati eseguiti con kit Human HER-2/neu Quantitative ELISA della Ditta Bayer (i dati sono espressi in ng/ml).

### Risultati:

Nei casi di CDI abbiamo osservato una media di valori di dosaggi di 10.7; nei casi di CLI pre-intervento 12.86, post-intervento 7.99; nei casi di CDIS 10.03 pre-intervento, 8.98 post-intervento; nei casi di CLIS pre-intervento 13.19, post-intervento 9.98; nei casi di CDL pre-intervento 9.77, post-intervento 8.67; nei casi di CM 10.30; nei casi di CT pre-intervento 11.41, post-intervento 7.21.

Cutt-off dei dati pre, post-intervento = 10 ng/ml

Cutt-off dei soggetti sani = 9.5

E' stato eseguito un test T-student che ha dato un valore di P inferiore a = 0.005

### Discussioni e conclusioni

Questo studio ha evidenziato una buona convergenza di valori rappresentati in differenti tipologie di diagnosi clinico-istopatologiche, in termini di efficacia del test e di sensibilità. Si ritiene pertanto importante porre l'accento sulla uniformità dei valori nei casi succitati sia prima del trattamento chirurgico che dopo. Infine basandoci sui dati fin ora ottenuti ci sentiamo di affermare che il test in questione potrebbe rappresentare un nuovo biomarcatore efficace nel tumore della mammella.

## SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DELL'SCC NEL FOLLOW-UP DEL CARCINOMA SQUAMOSO DELLA CERVICE UTERINA

Forni F., Scribano D., Zappacosta B., Antenucci M., Smaniotto D.\*, Morganti A.G.\*, Valentini V.\*, Macchia G\*, Cellini N.\*, Giardina B.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, \*Cattedra di Radioterapia - UCSC - Policlinico A. Gemelli, Roma

E' stato proposto l'utilizzo dell'SCC (Squamous Cell Carcinoma) antigen come fattore predittivo della risposta terapeutica e dell'outcome clinico delle pazienti con carcinoma squamoso della cervice uterina. A tale scopo abbiamo valutato l'accuratezza diagnostica di tale marker nel follow-up di pazienti trattate con radioterapia.

*Pazienti e metodi:* in 80 pazienti, affette da carcinoma squamoso della cervice, è stata determinata la concentrazione sierica dell'SCC all'atto della diagnosi, prima del trattamento radioterapico (radioterapia esclusiva, adiuvante, radiochemioterapia concomitante e brachiterapia). In un arco di tempo di circa 4 anni, le pazienti hanno eseguito prelievi seriati ad ogni controllo di follow-up, con una media di 4 determinazioni a paziente. Sono state eseguite complessivamente 300 determinazioni di SCC: per la valutazione dei risultati, è stato utilizzato un cut-off di 1,5 ng/ml. La valutazione clinica e strumentale dello stato di malattia è stata effettuata mediante radiografia del torace, CT o MRI dell'addome e della pelvi, US transrettale, colposcopia, PAP test ed esame fisico completo. Il dosaggio dell'SCC è stato eseguito con metodo MEIA su analizzatore automatico IMX (Abbott).

*Risultati:* alla fine dello studio, sono risultate valutabili 56/80 pazienti (esclusione dei casi sfuggiti al follow-up o senza determinazione di SCC pre-trattamento). Durante il periodo di osservazione, 9 su 56 pazienti hanno presentato recidiva e/o progressione di malattia. Mettendo in relazione i risultati degli esami standard eseguiti per il follow-up con i corrispondenti valori di SCC, sono stati evidenziati 45 tests veri negativi e 8 tests veri positivi. Un solo test è risultato falso negativo e 2 falsi positivi (positivizzazione più precoce dell'SCC?). La sensibilità del test è risultata dell'88,9%, la sua specificità del 95,7%. Il valore predittivo negativo è stato del 97,8%, con efficacia del test del 94,6%. In conclusione, la determinazione seriata dell'SCC sembra essere un metodo accurato per la valutazione delle pazienti con carcinoma squamoso della cervice trattate con radioterapia, in particolare per identificare l'assenza di recidiva e di progressione. Riteniamo che possa essere giustificato uno studio costo/efficacia a lungo termine, che paragoni le indagini standard del follow-up con un programma semplificato comprendente la valutazione clinica delle pazienti e la determinazione seriata dell'SCC.

### Bibliografia

Fuith LC., Daxenbichler G. Squamous Cell Carcinoma Antigen in patients with cancer of the uterine cervix. Gynecol Obstet Invest 1988; 26: 77-82

LA DETERMINAZIONE DEL PSA COMPLESSATO (cPSA): UN "ORIENTAMENTO" NELLA VALUTAZIONE DELLE PATOLOGIE PROSTATICHE

Fortunato A.

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo" - Vicenza

La determinazione del PSA Totale (tPSA) nella diagnosi e monitoraggio delle patologie prostatiche, sia di origine benigna che neoplastica, è ormai una pratica consolidata di tutti i laboratori sebbene si sia evidenziato che, a fronte di una elevata specificità tessutale, questo analita non risulta utile nella discriminazione tra iperplasia benigna e carcinoma. Per poter sopperire a questa mancanza di informazione si sono cercate alcune vie indirette per correlare la concentrazione del tPSA con la patologia: PSA Density (rapporto tra volume della ghiandola e concentrazione), PSA Velocity (incremento annuale della concentrazione), uso di valori soglia differenziati per età e rapporto tra la concentrazione del tPSA e del PSA Libero (fPSA). La determinazione della forma libera del PSA permette di aumentare la specificità clinica quando la concentrazione del tPSA è compresa tra 4.0 e 15.0 µg/L ma l'accuratezza di questa determinazione è influenzata da vari fattori: manipolazioni prostatiche (es. DRE o agobiopsie), temperatura e tempo di conservazione del campione, livello di concentrazione misurato, ecc. Recentemente è stato proposto un metodo commerciale per la determinazione del PSA Complessato (cPSA) (Bayer, Tarrytown USA) automatizzato su sistema ADVIA Centaur. Il sistema di anticorpi utilizzato in questo metodo permette di evidenziare tutte le molecole di PSA che sono legate a qualsiasi proteina (tranne la α-2 Macroglobulina che rende la molecola non immunoreattiva). La determinazione del cPSA dimostra caratteristiche di maggiore affidabilità rispetto alla misura del fPSA in quanto non è influenzato dalla preparazione del paziente (manovre diagnostiche) e dalla conservazione del campione<sup>1,4</sup>. Il calcolo del rapporto fPSA / tPSA può essere estrapolato anche con la misura del cPSA: tPSA = fPSA + cPSA; fPSA = tPSA - cPSA; fPSA / tPSA = (tPSA - cPSA) / tPSA. Vari autori<sup>5-7</sup> riportano evidenze che l'uso del cPSA rispetto al fPSA migliora la specificità senza perdere la sensibilità sia nell'intervallo di concentrazione tra 4.0 e 20.0 µg/L che tra 2.0 e 4.0 µg/L dove la determinazione del fPSA è poco indicata per la ridotta sensibilità analitica dei metodi di misura. Altri studi<sup>8</sup> dimostrano che i rapporti cPSA/tPSA e fPSA /tPSA sono clinicamente equivalenti. La determinazione del cPSA dimostra migliori specificità e sensibilità cliniche anche rispetto al solo tPSA e quindi potrebbe essere utilizzato come unico parametro di valutazione delle patologie prostatiche. Nel nostro laboratorio è stata fatta una valutazione preliminare del metodo per la determinazione del cPSA in una popolazione di 100 soggetti con età compresa tra 47 e 89 anni con valori di tPSA compresi tra 4.0 e 18.9 µg/L e sono stati confrontati i valori del rapporto fPSA/tPSA ottenuti con i metodi correntemente in uso e quelli ottenuti calcolando la frazione libera secondo l'equazione fPSA = tPSA - cPSA. La regressione secondo Passing & Bablok è data dalla retta con coefficiente angolare 0.96 ed intercetta 0.12 dimostrando una ottima correlazione tra i due metodi di valutazione come si evidenzia elaborando graficamente i dati con il diagramma di Bland & Altman. Solo nel 2% dei casi si sono evidenziate delle "incongruenze" tra determinazione del tPSA e cPSA in quanto sono stati ottenuti valori di concentrazione più elevati per il cPSA rispetto al tPSA. In tutti i casi si trattava di campioni con valori del rapporto fPSA / tPSA, misurati con i metodi correnti, al di sotto dell'8% e quindi in una zona di non "equimolarità" del metodo per la determinazione del tPSA. Anche se sono necessari ancora altri studi con la valutazione della corretta classificazione clinica dei campioni ottenuta utilizzando il solo cPSA, l'uso di tale parametro per il calcolo del rapporto tra la frazione libera del PSA e quella legata alle proteine comporta dei vantaggi analitici (stabilità del campione, sensibilità e riproducibilità del metodo) non trascurabili.

Bibliografia: 1) Arcangeli, J. of Urol, 158:2182-2187, 1997; 2) Piironen, Urology, 48(6A), 81-81, 1996; 3) Allard, Cheli et al. Int J Biol Markers, 14(2): 73-83, 2000; 4) Jung, et al. Clin Chem Lab Med; 38(12):1271-1275, 2000; 5) Braver et al., J Urology 163:1476-80, 2000; 6) Okegawa et al., Urology 55(5):700-704, 2000; 7) Croal et al., Clin Chem 46(6), Suppl 2000; 8) Stamey et al., J. of Urology 163: 119-126 (2000)

DIFFERENTE ESPRESSIONE DI ENDOGLINA (CD105), COMPONENTE DEL COMPLESSO RECETTORIALE PER IL TGF- $\beta$ , IN TUMORI SOLIDI UMANI: POSSIBILE USO COME MARCATORE TUMORALE.

<sup>1</sup>Di Domenico G, <sup>2</sup>Montagnani S., <sup>3</sup>Del Vecchio L., <sup>4</sup>Caraglia M, <sup>4</sup>Marra M., <sup>4</sup>Abbruzzese A., <sup>1</sup>Ladogana P., <sup>1</sup>Altamura S., <sup>1</sup>Postiglione L.

<sup>1</sup>Dip. Biol. e Patol. Cell e Mol. "L. Califano"; <sup>2</sup>Dip. Scienze Biomorfologiche, Un. "Federico II"; <sup>3</sup>Servizio Immunoematologia AORN "A. Cardarelli"; <sup>4</sup>Dip. Biochimica e Biofisica, II Università, Napoli.

L'Endogлина (CD105) è una glicoproteina omodimerica transmembrana, principalmente espressa sulle cellule endoteliali, identificata alcuni anni fa, usando un anticorpo monoclonale 44G4 prodotto dall'immunizzazione di topi Balb/c con una linea cellulare umana pre-B. Studi recenti hanno dimostrato che l'Endogлина interagisce con componenti della superfamiglia del TGF $\beta$  quali l'attivina A, BMP-7 e BMP-2. Scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare l'espressione in vitro dei livelli di proteina CD105 in differenti tipi di linee cellulari umane neoplastiche. Le linee cellulari utilizzate nel nostro studio sono state le seguenti (per un numero complessivo di 35 linee analizzate): A) Cellule umane normali di differente derivazione istologica (Controls): 1) cellule embrionali di rene (293), 2) mesenchima polmonare (MRC-5), 3) epitelio tiroideo (TAD), 4) endotelio da vena ombelicale umana (HECV), 5) fibroblasti di cute (HSF) B) Cellule umane di sarcoma di differente derivazione istologica: 1) osteosarcoma indifferenziato osseo (MG-63), 2) osteosarcoma differenziato osseo (SaOS-2), 3) condrosarcoma (SW1353), 4) rhabdomyosarcoma (A204), 5) fibrosarcoma (Hs913T), 6) sarcoma uterino (MES-SA), 7) sarcoma epitelioide (VA-ES-BJ), 8) liposarcoma (PK) C) Cellule umane di carcinoma di differente derivazione istologica: 1) ca. anaplastico della tiroide (ARO), 2) ca. follicolare della tiroide (WRO), 3) ca. del colon (CaCO2), 4) ca. dell'ovaio (SKOV-3), 5) ca. della mammella (MBA-MPA453), 6) ca. della vulva (A431), 7) ca. gastrico (MKN-28), 8) ca. della prostata (LNCaP), 9) ca. della cervice uterina (Hela), 10) epatocarcinoma (HEP-G2), 11) epatoma (LT-1), 12) adenoca. del polmone (H1355), 13) ca. midollare della tiroide (TT), 14) ca. dell'orofaringe (KB), 15) ca. del rene (ACHN), 16) ca. del pancreas (BXPC3) D) Cellule tumorali umane di varia natura: 1) tumore a cellule giganti dell'osso (C433), 2) retinoblastoma (Y79), 3) neuroblastoma (SK-N-BE), 4) melanociti di melanoma estratti da linfonodo metastatico (COLO853), 5) glioblastoma (CST-1). L'analisi iniziale dell'espressione di Endogлина su tali linee cellulari è stata eseguita mediante Western blotting, utilizzando il mAb murino anti-CD105 MAEND3 e confermata successivamente mediante immunofluorescenza diretta in citometria a flusso (FacsCalibur, Becton Dickinson), utilizzando uno specifico mAb di topo anti-CD105 (clone SN6, Valter Occhiena, Torino). I risultati ottenuti hanno dimostrato un "pattern" differenziale di espressione di Endogлина nelle differenti linee cellulari neoplastiche studiate, evidenziando una significativa differenza di espressione tra sarcomi e carcinomi (p<0.01). L'analisi della distribuzione morfologica del CD105, eseguita in microscopia di fluorescenza, ha confermato tali dati. Questi risultati inducono ad ipotizzare un potenziale uso applicativo di Endogлина come marker tumorale e target specifico bioimmunoterapeutico nei sarcomi.

DOSAGGIO DELLA 90K/MAC-2BP NEL SIERO DI PAZIENTI AFFETTI DA HCC: VALUTAZIONE CLINICA

Iacovazzi P.A.\*, Guerra V.\*\*\*, Elba S.\*\*\*, Barletta D.\*, Valenzano A.T. \*, Misciagna G.\*\*\*, Manghisi O.G.\*\*\*, Correale M\*.

\*U.O. Laboratorio di Patologia Clinica, \*\*Laboratorio di Epidemiologia e \*\*\*U.O. di Medicina Gastroenterologica, I.R.C.C.S. "S. de Bellis", Via della Resistenza, Castellana Grotte (BA).

90K/MAC-2BP è una proteina altamente glicosilata, coinvolta nell'immunità cellulo-mediata. Alcune osservazioni sperimentali associano alla 90K proprietà sia immunostimolanti, che immunomodulanti, come dimostrato dalla capacità di attivare le cellule NK e di legarsi ai CD14. Livelli sierici aumentati, rispetto ai gruppi di controllo, sono stati trovati in patologie neoplastiche (p.es. ovaio, mammella) ed in malattie croniche ad etiologia virale (HCV, HBV, HIV). In particolare, abbiamo trovato un aumento significativo dei suoi livelli nel 46% dei pazienti affetti da HCC ed una sensibilità diagnostica del 74% con l'uso combinato dell' $\alpha$  fetoproteina (AFP) e della 90K. Incoraggiati dai risultati ottenuti, abbiamo valutato, in questo studio, il valore prognostico, nella sopravvivenza dei pazienti con HCC, dei livelli sierici di AFP e di 90K.

Sono state considerate le concentrazioni di 90K ed AFP nel siero di 36 pazienti con HCC alla prima diagnosi, in assenza di terapia. Il dosaggio dell'AFP è stato effettuato utilizzando un sistema in chemiluminescenza (Immulate DPC, USA, cut-off: 20ng/ml), la 90K è stata dosata con metodica ELISA (Diesse, Siena, Italia, cut-off: 14  $\mu$ g/ml). Per la valutazione statistica dell'indice di sopravvivenza è stato usato il metodo Kaplan-Meier.

I risultati sono estremamente interessanti poiché hanno rivelato un aumento significativo della sopravvivenza sia nei pazienti con 90K sierica al di sotto di 14  $\mu$ g/ml ( $p=0.02$ , log rank), sia in quelli i cui i valori di 90K ed AFP erano entrambi inferiori ai rispettivi cut-off ( $p<0.02$ , log rank). Nessun aumento significativo della sopravvivenza è stato riscontrato, utilizzando, come fattore prognostico, la sola AFP.

In base ai dati ottenuti, pensiamo che, qualunque sia la possibile fonte della 90K nel siero dei pazienti con HCC, il dosaggio di questa interessante glicoproteina, affiancato a quello dell'AFP, potrebbe essere di valido aiuto per la valutazione prognostica del paziente affetto da HCC.

Bibliografia:

Iacovazzi P.A., Trisolini A., Barletta D., Elba S., Manghisi G., Correale M. Serum 90K/Mac-2BP glycoprotein in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a comparison with  $\alpha$ fetoprotein. Clin Chem Lab Med 2001; 39(10): 961-65.

proGASTRIN RELEASING PEPTIDE (proGRP), CROMOGRANINA-A (CgA) E ALTRI MARCATORI NEI TUMORI NEUROENDOCRINI (NETS)

Ferrari L., Seregini E., Martinetti A., Biancolini D., Ballabio G., Pallotti F., Coliva A., Bombardieri E.

Unità di Medicina Nucleare, Istituto Nazionale Tumori, via Venezian 1, 20133 Milano

*Introduzione.* La CgA è il marcatore disponibile più accurato per i NETs. Al contrario non si hanno dati sul valore del proGRP negli stessi tumori. *Scopo dello studio.* Valutare specificità e sensibilità cliniche del proGRP in pazienti con NETs e rispetto ad altri marcatori come la CgA, l'enolasi neurone specifica (NSE), l'antigene carcinoembrionale (CEA) e la calcitonina (Ct). *Pazienti.* Sono stati studiati 193 pazienti con NETs: 102 tumori gastroenteropancreatici (GEP) (11 foregut, 82 midgut, 9 hindgut), 17 carcinoidi polmonari, 8 carcinomi midollari della tiroide (MTCs), 6 carcinomi a cellule di Merkel (MCCs), 31 neuroblastomi (NB), 8 paragangliomi (PG), 5 peripheral neuroectodermal tumours (pNETs), 4 NETs di altro tipo e 14 NETs a primitività ignota. *Metodi.* proGRP (Advanced Life Science, Giappone) e CgA (DAKO, Danimarca) sono stati misurati con metodi immunoenzimatici, mentre NSE (Cis, Francia), CEA (Radim, Italia) e Ct (Scantibodies, USA) con saggi immunoradiometrici. *Risultati.* Specificità e sensibilità dei marcatori, in accordo con la localizzazione del tumore, furono come segue.

Tumore	Marcatore	Specificità	Sensibilità
GEPNET	proGRP	88.5%	14.5%
	CgA	92.3%	73.7%
NET polmone	proGRP	66.7%	22.2%
	CgA	100%	66.7%
PG	proGRP	-	14.3%
	CgA	-	71.4%
MTC	proGRP	-	87.8%
	Ct	-	100%
	CEA	-	87.5%
MCC	proGRP	100%	25.0%
	CgA	100%	0%
NB	proGRP	-	64.3%
	CgA	-	42.9%
	NSE	-	57.1%
pNET	proGRP	-	40.0%
	CgA	-	60.0%
Sede ignota	proGRP	-	42.9%
	CgA	-	64.3%

*Conclusioni.* L'accuratezza del proGRP è generalmente minore di quella della CgA e degli altri biomarcatori correntemente usati nella diagnosi e nella sorveglianza dei pazienti con NETs. Tuttavia, il proGRP merita di essere ulteriormente indagato nel NB per la sua apparentemente elevata sensibilità in questa neoplasia.

### IMPORTANZA DELL'ESAME DELLE URINE NELLA VALUTAZIONE MEDICO-SPORTIVA: CASE-REPORT

Flacco L., Calvarese M., \*Amoroso L., \*\*Faricelli R, D'Aquino M.L., Gelormini R, Gioia S., Filippi G, D'Amico V., Martinotti S.

Medicina dello Sport A.S.L. Chieti; \*Clinica Nefrologica Università di Chieti; \*\*Laboratorio Patologia Clinica ASL Chieti

**CASO CLINICO:** D'A. P., 13 anni, giunto alla nostra osservazione per visita di idoneità alla pratica sportiva agonistica del karatè, presenta anamnesi familiare e fisiologica negativa, anamnesi patologica positiva per i comuni esantemi infantili e per tonsillectomia all'età di circa 6 anni. All'anamnesi sportiva riferisce praticare karatè da circa tre anni e di eseguire regolare allenamento due volte a settimana e di non accusare alcun disturbo di natura fisica in corso di allenamento o gara. L'esame obiettivo generale (cutaneo, osteo-scheletrico, respiratorio, cardiaco, neurologico ed addominale) risulta nella norma, come pure la valutazione antropometrica (h: 163 cm., p: 59 Kg.), la manovra del Giordano risulta negativa bilateralmente, la P.A. mostra un valore pari a 120/55 mmHg.

Le indagini strumentali eseguite evidenziano: prove di funzionalità respiratoria (CFV e MVV) nella norma; ECG di base nella norma; ECG dopo sforzo mediante step test: ritmo sinusale, alti voltaggi dei complessi rapidi ventricolari; ecocardiogramma nella norma. L'esame delle urine segnala aspetto torbido, tracce di emoglobina e proteine (++) all'esame chimico-fisico, alcuni leucociti, numerose emazie e molti urati amorfi all'esame microscopico del sedimento. Sulla base di tale referto si decide di sospendere il giudizio di idoneità e viene richiesto un controllo dell'esame urine. In seguito alla persistenza di microematuria e proteinuria, il piccolo viene indirizzato al ricovero presso la Clinica Nefrologica dell'Ospedale Clinicizzato "Colle dell'Ara" di Chieti. Le indagini ivi eseguite mostrano: esame urine: proteinuria (80 mg % in media), 5-10 emazie per campo, rari cilindri ialino-granulosi ed alcuni cristalli di ossalato; ecografia renale: nella norma; biopsia renale (frustolo dal polo inferiore del rene sinistro): 7 glomeruli di cui 2 in sclerosi totale e 2 in sclerosi parziale, cellularità mesangiale focale, segmentaria, crescents fibrose e segmentarie complete in un solo glomerulo, crescents moste (cellulari e fibrose) parziali in un solo glomerulo, tubuli: cilindri proteici, interstizio: infiltrati linfomonocitari focali periglomerulari, fibrosi focale. Il piccolo viene quindi dimesso con diagnosi di "Nefropatia glomerulare proliferativa mesangiale" ed invitato al controllo dopo un mese, previa esecuzione di nuovo esame completo delle urine e di ulteriori indagini di controllo (azotemia, creatininemia, uricemia, elettroliti sierici, glicemia a digiuno, protidemia, emocromo, urinocoltura, elettroforesi sieroproteica, VES, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e IDR) risultate nella norma durante il ricovero. In attesa di tali controlli si è deciso di sospendere il giudizio di idoneità sportiva.

**CONCLUSIONI:** Il caso clinico presentato rimarca l'utilità dell'esame completo delle urine nell'ambito della medicina dello sport.

### PROFILO EMATOLOGICO DI BASE NEGLI ATLETI

Fanelli A., Del Genovese A., Rossetti M., Bruschettoni A., Balboni F., Statello M., Iordache L., Mercurio S., Messeri G

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze, Italia

Negli ultimi anni il ruolo della medicina di laboratorio nello sport ha assunto una sempre maggiore importanza. Il laboratorio svolge infatti un compito fondamentale nella valutazione dello stato di salute e di forma dell'atleta e nell'identificazione del fenomeno del doping. A tal fine, l'interpretazione dei dati di laboratorio deve presupporre il ricorso ad intervalli di riferimento specifici. Gli atleti rappresentano infatti una popolazione sana nella quale il particolare stile di vita, il grado (moderato/intenso) e il tipo (resistenza/potenza) di attività fisica, nonché le alterazioni del bilancio idro-elettrolitico e i continui traumatismi, comportano modificazioni dei parametri ematochimici rispetto alla popolazione generale. Lo scopo del nostro lavoro è di valutare il profilo ematologico di base in 40 podisti dilettanti e in 32 ciclisti dilettanti in confronto con 38 individui sani sedentari di pari età e sesso. I parametri biochimici valutati sono: esame emocromocitometrico con reticolociti ed indici reticolocitari (Sysmex XE2100); ferritina, transferrina e recettori solubili della transferrina (BNII Dade Behring) e sideremia. I principali risultati sono mostrati in tabella.

#### PODISTI

	GR	HG	HCT	RET%	RET#	LFR	MFR	HFR
X	4,70	14,0	42,1	0,98	0,046	87,4	10,9	1,73
DS	0,35	1,07	2,77	0,29	0,014	3,51	2,86	0,90

#### CICLISTI

	GR	HG	HCT	RET%	RET#	LFR	MFR	HFR
X	4,78	14,4	44,2	0,81	0,039	94,5	5,33	0,23
DS	0,20	0,67	2,33	0,26	0,013	2,37	2,24	0,27

#### NORMALI

	GR	HG	HCT	RET%	RET#	LFR	MFR	HFR
X	4,88	15,1	45,3	0,94	0,045	92,0	7,47	0,56
DS	0,31	0,84	2,26	0,27	0,014	3,43	3,12	0,48

I ciclisti e i podisti mostravano, rispetto ai soggetti normali, valori significativamente inferiori in termini di GR, HB, HCT, MCV e ferritina, mentre transferrina e recettori solubili della transferrina risultavano significativamente più elevati. I reticolociti non mostravano differenze significative rispetto ai soggetti normali. I ciclisti e i podisti non mostravano differenze statisticamente significative fra di loro nei diversi parametri. I dati raccolti confermano l'importanza dell'individuazione di range di accettabilità specifici del profilo ematologico di base negli atleti. La definizione degli intervalli di riferimento, associata allo studio della variabilità biologica in funzione dei carichi di allenamento, può consentire una corretta interpretazione dei dati di laboratorio nella valutazione dell'assunzione impropria di sostanze (doping).

## OXIDATIVE STATUS IN SMOKERS

Ippolito S.<sup>o</sup>, Lonati S.<sup>o</sup>, Novembrino C.<sup>o</sup>, Soresi E.\* , Bamonti F.<sup>o</sup>

<sup>o</sup>Dpt Scienze Mediche, Università-Ospedale Maggiore IRCCS, via F. Sforza, 35 20122 Milano \*Primario emerito di Tisiologia Ospedale Niguarda, Milano

Cigarette smokers run a greater risk of developing cardiovascular disease or tumours and can show unbalanced oxidative status due to the large amounts of free radicals contained in tobacco smoke. Besides, tobacco smoking can lead to cellular ageing. To evaluate the possible influence of smoke both on the pro-oxidant/antioxidant status and on the metabolism of homocysteine (Hcy), a well known independent risk factor for vascular disease, a perspective study was performed on two groups of smokers, preselected as regard sex, age, habits of life and different number of cigarettes (8 subjects <30 cigarettes/day, group A and 8 subject >30 cigarettes/day for at least 35 years, group B). Each smoker showed no respiratory symptoms.

Fasting peripheral blood samples were drawn to detect Hcy and metabolically correlated vitamins (vit B12, serum end erythrocytes folate, s-F and ery-F respectively) concentrations measured by relevant immunoenzymatic assays (Abbott, USA) on IMx analyzer (Abbott, USA). The concentrations of reactive oxygen metabolites (d-ROMs), and thiol groups (-SH) and the total antioxidant capacity (OXY-ADS) were measured by relevant spectrophotometric methods (Diacron, Italy) on F.R.E.E. analyzer (Diacron, Italy).

Results (Wilcoxon's test):

Analyte	A group (media±DS)	B group (media±DS)
reference interval		
Hcy <10µmol/L	8.8±2.3	12.6±7.8
Vit B12 164-835 pmol/L	341±116	205.8±101.0
s-F 7-28nmol/L	11.8±4.4	12.5±3.6
ery-F 421-1462 nmol/L	801±326	686.6±138.5
dROMs 250-300 UCarr	216±73	309.8±46.5
OXY-ADS		
>350 µmol HClO/mL	374±21	302.7±40.9
-SH 450-650 µmol/L	389±79	334.3±58.0

Our data show an unbalanced Hcy metabolism (increased Hcy and lower vitamin concentrations) in group B as compared to group A even if differences are not significant. Similarly, group B showed the presence of greater oxidative stress than group A. Our study shows that the more cigarettes people smoke, the more unbalanced their oxidative status becomes. Cigarette smoking together with the prooxidant action of hyperhomocysteinemia could be considered an additional risk factor leading to cellular ageing. The pattern of our simple assays can be used as a diagnostic tool in clinical prevention of cellular ageing.

Lykkesfeldt J. et al, Am J Clin Nutr, 71: 530-6, 2000

## DIAGNOSTICA PER DIABETE MELLITO E STATI DI INTOLLERANZA GLUCIDICA

\*Cosio G., \*Peer E., \*Dal Checco P., \*Floreani M., \*Raffagnini A., \*Daves M., <sup>o</sup>Fattor B.

\*Laboratorio di Biochimica Clinica, <sup>o</sup>Servizio di Diabetologia, Medicina 1<sup>o</sup>, Azienda Sanitaria di Bolzano

Obiettivo di questa sintesi è quello di offrire un rapido strumento d'uso relativamente all'interpretazione dei valori glicemici in soggetti asintomatici o con sintomi non specifici di alterazione del metabolismo glucidico.

La sintesi non è applicabile alle donne in gravidanza.

Nel nostro lavoro vengono evidenziati i nuovi criteri di classificazione dell'American Diabetes Association (ADA) per la diagnosi della malattia diabetica (DM). Per valori glicemici < 110 mg/dl si consiglia: 1) nei soggetti senza alcun rischio per DM una glicemia a digiuno (FPG) a partire da una età > 45 anni, 2) nei soggetti ad alto rischio di DM (familiarità di 1° grado per DM, precedente diagnosi di Alterata glicemia a digiuno -IFG-, obesità, ipertensione arteriosa, dislipidemie, storia di pregressa gravidanza gestazionale, policistosi ovarica) si consiglia FPG anche per età < 45 anni, con frequenza annuale o valutabile da caso a caso; per valori glicemici compresi tra 110 e 125 mg/dl (IFG): 1) solo se confermata in una seconda occasione fa porre diagnosi di IFG, 2) se la IFG è confermata è necessario fare un check dei fattori di rischio cardiovascolare e di eventuale presenza di macroangiopatie (ECG, EcoColorDoppler TSA), 3) eseguire ogni sei mesi un FPG ed una glicemia post-prandiale, 4) eseguire un OGTT (curva da carico a 2 punti -0 e 120 minuti- con 75 grammi di glucosio) ogni anno al fine di diagnosticare l'eventuale progressione verso il DM (una glicemia alla 2° ora ≥ 200 mg/dl fa porre diagnosi di DM); per valori glicemici ≥ 126 mg/dl: 1) solo se confermata in una seconda occasione fa porre diagnosi di DM.

Concludendo le principali modifiche diagnostiche proposte dall'ADA sono: 1) l'abbassamento dei valori della glicemia a digiuno, diagnostici di diabete, da 140 a 126 mg/dl, 2) la raccomandazione di non utilizzare l'OGTT, ma solo la glicemia a digiuno (FPG) per la diagnosi clinica, 3) la proposta di una nuova categoria di intolleranza ai carboidrati, la IFG (Alterata glicemia a digiuno) (1).

1) Porta M, Bolli G, Bosi E, Di Mario U, Fedele D, Genovese S, Muggeo M, Pagano G I criteri ADA per la classificazione e la diagnosi del diabete. G Ital Diabetol 1999; 19:81-95.

STABILITÀ DEI PRODOTTI DELL'OSSIDAZIONE  
PROTEICA AVANZATA DURANTE LA CONSERVAZIONE  
DEL CAMPIONE E CORRELAZIONE CON ALTRI  
PARAMETRI CLINICI

Rossi L., Lucchetti A., Mariani S., \*Matteucci E.,  
\*Giampietro O., Innocenti B.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1,  
Azienda Ospedaliera Pisana

\*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

*Scopo del lavoro:* Anche le proteine subiscono il danno ossidativo e possono andare incontro a modificazioni strutturali e funzionali. L'ossidazione delle proteine plasmatiche è stata quantificata mediante un marcatore di stress ossidativo (advanced oxidation protein products, AOPP) ed espressa in equivalenti di clorammina-T, misurati in base all'assorbimento, a 340 nm, del plasma in ambiente acido ed in presenza di ioduro di potassio.

*Materiali e metodi:* Abbiamo dosato i livelli plasmatici di AOPP in 51 pazienti affetti da patologie cardiovascolari, polmonari, gastrointestinali, renali e metaboliche. Sono stati dosati: VES, azotemia, creatinemia, glicemia, uricemia, elettroliti, pannello lipidico, proteinemia totale e frazioni, fibrinogenemia. Per valutare la possibilità di conservare il campione plasmatico senza decrementi dei livelli di AOPP misurati, 24 dei 51 campioni sono stati processati immediatamente al momento del prelievo e dopo 7, 15, 30, 90, 180, 438 giorni di congelamento, sia a -20 che a -80° C (ogni aliquota era congelata e scongelata una sola volta). Sui rimanenti 27 campioni è stato eseguito anche il dosaggio delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (thiobarbituric-acid-reactive substances, TBARS).

*Risultati:* La concentrazione media di AOPP nei pazienti esaminati è risultata di  $48.8 \pm 37.3 \mu\text{mol/l}$ . La concentrazione basale nei 24 campioni ( $55.0 \pm 47.1 \mu\text{mol/l}$ ) non ha subito modificazioni significative fino a 438 giorni di congelamento, quando aumentava sia nei campioni conservati a -80° C ( $96.6 \pm 83.2 \mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.01$ ) che, più marcatamente, in quelli conservati a -20° C ( $171.3 \pm 94.6 \mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.001$ ). I livelli di TBARS sono risultati di  $1.59 \pm 0.65 \text{ mmol/ml}$ . L'analisi di regressione multipla ha evidenziato che la concentrazione di AOPP correlava ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.001$ ) positivamente con azotemia e trigliceridemia, negativamente con l'età del paziente (albumina e proteine plasmatiche totali si riducono con l'età,  $r = 0.3$ ,  $p < 0.05$ ). La concentrazione di TBARS correlava con VES e glicemia ( $r$  multipla  $0.73$ ,  $p < 0.001$ ), e positivamente con AOPP ( $r = 0.39$ ,  $p < 0.05$ ).

*Discussione e conclusioni:* La concentrazione di AOPP resta stabile nei campioni congelati a -20° e -80° C fino a 6 mesi. Il riscontro di una correlazione con azotemia e trigliceridemia suggerisce che l'insufficienza renale e la dislipidemia accelerano probabilmente in vivo il processo di formazione di AOPP. Il danno ossidativo valutato dai TBARS può essere potenziato dall'esposizione all'iperglicemia e dalla conseguente glicosilazione non enzimatica delle proteine plasmatiche.

EVALUATION OF AN IMMUNOASSAY SPECIFIC FOR  
SERUM TARTRATE-RESISTANT ACID PHOSPHATASE  
(s-TRAP)-5b ISOFORM

Pagani F., Boselli C., Panteghini M.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda  
Ospedaliera "Spedali Civili", 25125 Brescia

Osteoclasts express TRAP and secrete it into the circulation during bone resorption. This suggests that s-TRAP may be a useful marker of bone resorption. However, human serum contains two forms of s-TRAP, namely 5a and 5b, of which 5b is derived from osteoclasts and 5a from other, as yet unidentified sources. The only structural difference between these two forms is that 5a contains sialic acid that is not found in 5b. Traditional s-TRAP enzymatic assays, measuring total isoenzyme, are not s-TRAP-5b specific. Here we report the preliminary evaluation of the recently developed BoneTRAP® assay (SBA Sciences - distributed by Pantec) for measurement of s-TRAP-5b. The method uses a monoclonal antibody (MAb O1A) to bind s-TRAP in a solid-phase format. After the enzyme capture, s-TRAP-5b is specifically determined by measuring its catalytic activity using 4-nitrophenyl phosphate as substrate at pH 6.1, where 5a isoform is completely inactive. Intraassay CV ( $n=10$ ) for two human serum pools with normal (3.0 U/L) and borderline (4.4 U/L) s-TRAP-5b activities were 1.85% and 1.02%, respectively. To assess the practical potential of the s-TRAP-5b, a comparison was made with other markers of bone turnover, including serum bone alkaline phosphatase (BAP) and osteocalcin, and free deoxyypyridinoline (DPD) and N-terminal telopeptide of type I collagen (NTX) in the corresponding urines (results corrected for creatinine excretion), in 32 patients with metabolic bone disease. Results of s-TRAP-5b significantly correlated with BAP ( $r=0.63$ ,  $P < 0.001$ ), osteocalcin ( $r=0.80$ ,  $P < 0.001$ ), and DPD ( $r=0.39$ ,  $P=0.027$ ) but not with NTX ( $r=0.30$ ,  $P=0.095$ ). 40 subjects presenting normal renal function or different degrees of severity of renal failure, as assessed using endogenous creatinine clearance (CrCl), were also studied to exclude any influence of kidney retention on s-TRAP-5b. Impaired renal function was not associated with an increase in s-TRAP-5b (log s-TRAP-5b vs. CrCl,  $r=-0.11$ ,  $P=0.49$ ). When the data were stratified into 3 subgroups according to the CrCl, 25% of patients with a CrCl of  $<30 \text{ mL/min}$  had elevated activities of s-TRAP-5b [median (and range), 3.2 U/L (1.8-8.5)], in patients with a CrCl of 30-59 mL/min, s-TRAP-5b was elevated in 11% [3.5 U/L (2.2-5.5)], and a CrCl between 60 and 90 mL/min led to elevated s-TRAP-5b values in 14% of the patients [3.0 U/L (1.5-6.0)] (chi-square=0.76,  $P=0.68$ ). These results suggest that the kidney function has no effect on s-TRAP-5b activity. Further studies are however needed to optimize the use of this marker in the clinical setting, starting from understanding why the highest correlation coefficients were obtained in the comparison with the bone formation markers.

## INCIDENZA DI COMPONENTI MONOCLONALI IN PAZIENTI AFFETTI DA HCV

Landi N., Batini I., Teleso D., Mantellassi B., Pellegrini G., Pardini E..

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Presidio Ospedaliero Cisanello, Via Paradisa n.2 56124 Pisa.

**Obiettivo della ricerca:** Scopo di questo lavoro è verificare la correlazione tra pazienti con epatite cronica da HCV e comparsa di componenti monoclonali. Sono stati utilizzati come controllo negativo pazienti affetti da Epatite cronica B.

**Materiali e metodi:** Sono stati analizzati 50 sieri di pazienti: HCV positivi (30 casi) e HBV positivi (20 controlli).

Il metodo utilizzato per la ricerca delle componenti monoclonali è Hydragel 4 IF (SEBIA) che permette l'identificazione di proteine monoclonali mediante elettroforesi e successiva immunofissazione con antisieri specifici.

Il fattore reumatoide è stato dosato con metodica nefelometrica (BNA II DADE)

**Risultati:** Su 30 campioni HCV positivi testati 4 hanno presentato componenti monoclonali, mentre nei controlli (HBV +) solo in un paziente è stata evidenziata una componente monoclonale.

PAZIENTI HBV POSITIVI CON COMPONENTE MONOCLONALE



PAZIENTI HBV POSITIVI CON COMPONENTE MONOCLONALE



**Conclusioni:** Dato il basso numero di pazienti fino ad ora valutati, il campione di popolazione preso in considerazione (HCV+) non mostra ancora (come documentato dalla letteratura) una differenza statisticamente significativa per la presenza di componenti monoclonali rispetto al gruppo di controllo (HBV+). Lo studio verrà proseguito con arruolamento di nuovi pazienti HCV + per maggiori approfondimenti.

### BIBLIOGRAFIA:

- G.P. Merlini, I. Zorzoli, E. Anesi, V. Perfetti, G. Marinane: Immunochemical characterization of the cryoglobulin; pathophysiological implication. Clin Exp Rheumatol 1995; 13 (suppl. 13):71-3.
- J.C. Brouet, J.P. clauvel, F. Danon et al.: Biological and clinical significance of cryoglobulins. Am J. Med 1974; 57: 775-88.

## REFERENCE INTERVAL FOR LDH ACTIVITY IN SERUM MEASURED ACCORDING TO THE NEW IFCC RECOMMENDATIONS

Pagani F., Bonora R., Confortini S., Panteghini M.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", 25125 Brescia

Recently, IFCC established new 37 °C reference procedures (RP) for measurement of ALT, AST, CK, GGT, and LDH catalytic activities. In this study we determined the reference interval for LDH activity as measured according to the new IFCC RP (1). The LDH measurements were performed with a Dade Behring Mega analyzer using home-made reagents. This system was validated by direct comparison with the IFCC LDH RP performed in our certified reference laboratory, using IRMM/IFCC CRM 453 for accuracy control. In particular, 50 fresh sera were assayed in duplicate across four different runs. Linear regression analysis gave the following results:  $y$  (Mega) =  $0.999 (\pm 0.002) x - 0.11 (\pm 0.78)$ ,  $Syx = 2.6$  U/L,  $r = 0.9999$ . Evaluating the intermethod bias, the mean differences (absolute and in percentage) were:  $-0.3$  U/L [95% confidence interval (CI):  $-1.0/+0.4$ ] and  $-0.10\%$  (CI:  $-0.37/+0.17$ ), respectively. All Mega runs were also validated by the CRM 453 results [mean  $\pm$  SD:  $503.8$  U/L  $\pm 9.7$ , CV =  $1.93\%$ ; certified value (SD):  $502$  U/L (7.0)]. Serum specimens from 157 apparently healthy individuals were then analysed. The subjects, aged 18-66 years, were selected using the IFCC recommendations for the production of reference values. The 95% inner reference interval was  $125$  U/L (CI:  $119-130$ ) –  $220$  U/L (CI:  $215-225$ ) with no sex-related differences.

### Reference:

1. Schumann G, Bonora R., Ceriotti F., et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. Clin Chem Lab Med 2002; 40: in press.

PROTEOME ANALYSIS OF RENAL CELL CARCINOMA  
SUBCELLULAR FRACTIONS: PRELIMINARY STUDIES

Raimondo F., Pitto M.

Department of Experimental, Environmental Medicine and  
Medical Biotechnology, University of Milano-Bicocca.

Two-dimensional (2-DE) electrophoresis is the method of choice for the study of proteome since such technique is characterized by the highest resolution for protein separation in complex samples. However, in current proteome projects the total number of proteins identified from 2-DE gels is often only a small percentage of the predicted ones. In fact, in spite of considerable improvements in the methodology for image management and spot detection, some areas of 2DE gels are so crowded that correct analysis meets many difficulties. At this regard, a simplification of protein pattern could be obtained by analysing subcellular organelles-enriched preparations: in such case a better resolution could be achieved, through a reduction of the spot number. In the meanwhile less-expressed proteins would be enriched for further analysis. Within a general research project regarding proteome of renal carcinoma, our task is to prepare and analyse subcellular fractions, characterised by specific protein profiles, in order to assess differences between normal and neoplastic tissue.

Subcellular fractions have been prepared from normal and tumoral renal tissue of patients after surgical removal of affected kidney, by differential and density gradient centrifugation. Mitochondrial fractions were characterized for marker enzyme activities (isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase) and immunoblotting with suitable antibodies. Plasmamembrane fractions enriched in caveolae were also prepared and their purity checked by western blotting analysis using anti-caveolin. Co-localization of P-glycoprotein, involved in Multi Drug Resistance phenomena, with caveolin was assessed. 2-DE analysis of subcellular fractions shows that a simplification of the protein pattern has been achieved and a subset of specific proteins has been enriched in any fraction: this will allow to better highlight differences in the protein expression between cancer and control tissue.

PARAMETRI DI PEROSSIDAZIONE LIPIDICA E  
ATTIVITÀ GLICOIDROLASICHE NELLE MEMBRANE  
PLASMATICHE DEL GLOBULO ROSSO IN SOGGETTI  
ANZIANI SANI

Goi G<sup>a</sup>, Massaccesi L.<sup>a</sup>, Lombardo A.<sup>a</sup>, Cazzola R.<sup>b</sup>, Russo  
Volpe S.<sup>b</sup>, Cestaro B.<sup>b</sup>, Rondanelli M.<sup>c</sup>, Ferrari E.<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Dip. di Chim. Biochim. Med., Univ. Milano

<sup>b</sup>Dip. di Sc. Precliniche LITA Vialba, Univ. Milano

<sup>c</sup>Dip. Med. Int. e Ter. Med., sez. Geriatr., Univ. Pavia

*Obiettivo.* Valutare lo stato della perossidazione lipidica e della fluidità delle membrane eritrocitarie in soggetti anziani sani e correlarlo con le attività di alcune glicoidrolasi di membrana del globulo rosso. *Metodi.* Sono stati reclutati 13 soggetti anziani sani (età media, anni:  $82 \pm 6.4$ ) e 13 soggetti giovani sani (età media, anni:  $26 \pm 3.0$ ). Sono stati determinati i seguenti parametri: il potenziale perossidativo del plasma espresso come la durata in minuti della fase di latenza (Lag-time) delle cinetiche di lipoperossidazione, i livelli plasmatici delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'anisotropia di fluorescenza del DPH (rs), parametro inversamente correlato con lo stato della fluidità delle membrane. Sono state dosate con metodo fluorimetrico le attività dei seguenti enzimi:  $\alpha$ -L-mannosidasi,  $\beta$ -D-glucuronidasi (GCR),  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-galattosidasi,  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-glucosidasi, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasi,  $\alpha$ -L-fucosidasi, la sialidasi acida e quella neutra.

*Risultati.* I valori dei perossidi plasmatici e dell'rs degli anziani sono significativamente aumentati mentre il Lag-time diminuito rispetto a quelli dei giovani ( $p < 0.01$ ). Gli anziani presentavano, inoltre, una significativa diminuzione dei livelli della GCR e della sialidasi neutra ( $P < 0.01$ ). Sono state rilevate correlazioni inverse tra l'attività della sialidasi neutra e l'età dei soggetti ( $r = -0.85$  e  $-0.87$  rispettivamente), i livelli dei ROS ( $r = -0.56$  e  $-0.52$  rispettivamente) e i valori di rs ( $r = -0.77$  e  $-0.79$  rispettivamente).

*Discussione.* Questo studio ha evidenziato che gli anziani, anche se apparentemente sani, presentano un significativo aumento dei processi di perossidazione lipidica che si riflette in un irrigidimento delle membrane eritrocitarie, probabilmente dovuto alla deplezione di PUFA ed alla formazione di legami crociati a livello delle proteine e dei fosfolipidi di membrana, promossi da polialdeidi, quali la MDA. La conseguente riduzione del grado di libertà di proteine di membrane è probabilmente alla base della riduzione dell'attività della GCR e della sialidasi neutra osservata nella popolazione anziana. Preliminarmente, il dato più interessante sembra essere quello relativo alla sialidasi neutra che, a differenza di quella acida, è attiva sui sialoderivati presenti nella stessa membrana. Poiché questa forma enzimatica è notoriamente predominante negli eritrociti senescenti, si può ipotizzare che gli eventi perossidativi presenti nell'anziano possano in qualche modo interferire nel fisiologico invecchiamento della popolazione eritrocitaria.