

PLASMA CHITOTRIOSIDASE ACTIVITY IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS

Rossi R.\*, Farina M.G.\*, Sorba G.§, Carru C.\*, Cossu M.§, Pes G.M.\*, Deiana L.\*

\*Chair of Clinical Biochemistry, University of Sassari; §Nephrology and Dialysis Unit, Azienda Ospedaliera n. 1 – Sassari, Italy

Chitotriosidase (EC 3.2.1.14) is a functional chitinase synthesized by activated macrophages. Its activity in plasma increases in Gaucher disease and other lysosomal storage disorders,  $\beta$ -thalassemia, and various infectious and immunological diseases in which activated macrophages are involved. In renal transplant patients (RTPs) despite the immunosuppressive treatment the kidney may be infiltrated by inflammatory cells, a high proportion of which are macrophages. Indeed, early macrophage infiltration of the transplanted kidney is a poor prognostic sign for transplant survival. Therefore, monitoring macrophage function through determination of plasma chitotriosidase activity in RTPs might be useful in the clinical management of such patients. In the present study the level of plasma chitotriosidase was evaluated in 80 RTPs (42 men, 38 women) as well as in 80 control subjects. Chitotriosidase activity was measured fluorimetrically according Hollak et al. (1) using 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriose as a fluorescent substrate. The activity was expressed as nmoles of substrate hydrolysed per min per mL (mU/mL). Plasma chitotriosidase activity was significantly increased in RTPs ( $0.97 \pm 0.60$  mU/mL) in comparison to controls ( $0.60 \pm 0.50$ ;  $P=0.001$ ). This difference still persisted when chitotriosidase activity was adjusted for glomerular filtration rate. Twelve out of 80 (15%) RTPs had chitotriosidase activity above upper reference value (1.7 mU/mL) whereas only 4 out of 80 (5%) were found among control subjects. The RTPs who were carriers of heterozygous  $\beta$ -thalassemia did not show significantly higher enzyme activity ( $0.93 \pm 0.55$ ) than noncarriers ( $0.99 \pm 0.62$ ;  $P>0.05$ ). Enzyme activity was higher in patients with previous chronic glomerulonephritis (1.21 mU/mL). Only one RTP (<1%) was found to have chitotriosidase deficiency (<0.001 mU/mL) whereas 2 subjects were deficient among controls (2.5%). None of the variables, including age, sex, follow-up and plasma creatinine showed a significant correlation with chitotriosidase in RTPs.

Conclusions: in RTPs plasma chitotriosidase is elevated, despite the immunosuppressive treatment, probably because an activation of macrophages occurs. However, additional studies are needed to assess if the measurement of plasma chitotriosidase activity may be useful in monitoring RTPs for acute rejection.

[1] Hollak CE et al. J Clin Invest 93 :1288-1292, 1994.

L'INTERLEUCHINA-2 NEL LIQUIDO SEMINALE

Boetto M., Grillo A., Biancotti P.P.

Azienda Sanitaria Ospedaliera S.Giovanni Battista di Torino, Corso Bramante 88, 10126 Torino

Nello studio dell'infertilità maschile sono state prese in considerazione in tempi recenti le citochine (1). In particolare per l'interleuchina-2 (IL-2) è stato proposto un ruolo preminente in relazione alle patologie che interessano l'apparato riproduttivo maschile e ne condizionano l'efficienza (2). Dal momento che l'impiego del citofluorimetro nell'analisi del liquido seminale permette, oltre alla determinazione di parametri come la concentrazione e la vitalità degli spermatozoi, la concentrazione e la tipizzazione dei leucociti, anche il dosaggio di citochine (3), si è ritenuto utile applicare il dosaggio di IL-2 nel liquido seminale alla nostra casistica e ricercarne le relazioni statistiche con gli altri parametri.

Non si è evidenziata una correlazione significativa tra i valori di IL-2 e la concentrazione degli spermatozoi, la motilità, la percentuale di forme normalmente conformate, la vitalità. Sono invece state rilevate differenze significative per la concentrazione dei leucociti nel liquido seminale ed in relazione alle condizioni che hanno portato i pazienti all'analisi.

Nella casistica studiata, infatti, in base a livelli minori di IL-2 nel liquido seminale, la popolazione con processi flogistici e presumibilmente senza alterazioni della spermatogenesi si differenzia dalle due rimanenti considerate (soggetti motivati all'analisi rispettivamente per varicocele e per infertilità) che sono accomunate da problemi relativi alla produzione di spermatozoi con normale capacità fecondante. Si prospetta pertanto l'interesse di proseguire gli studi con la metodica utilizzata su casistiche maggiori ed il dosaggio citofluorimetrico di ulteriori citochine.

Riferimenti bibliografici:

- (1) Dousset B., Hussenet F. Cytokines in human semen. A new approach to male fertility. Presse Med 26: 24-29, 1997
- (2) Paradisi R., Capelli M., Mandini M. et al. IL2 in seminal plasma of fertile and infertile men. Arch Androl 35: 35-41, 1995
- (3) Ferrara F., Rosani M. Quantitative flow cytometric estimation of seminal plasma interleukin-2 in subjects affected by varicocele. Eur J Histochem 43: 62, 1999.

## ISOENZIMI DELLA FOSFATASI ALCALINA IN AUTOMAZIONE

Maiavacca R., Felicetta I., Ratti M.G., Monasteri M.F., Zanferrari T., Torresani E.

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

La determinazione della fosfatasi alcalina (ALP) nel siero umano è un test indispensabile nella diagnosi di malattie ossee ed epatobiliari. Una svolta essenziale per l'interpretazione del significato clinico di questo enzima è stato il riconoscimento della sua eterogeneità molecolare e la possibilità di discriminare le varie frazioni isoenzimatiche. Infatti, molto spesso, in presenza di valori di ALP totale normali, l'analisi isoenzimatica mette in evidenza frazioni patologiche capaci di orientare il clinico e dirimere un sospetto diagnostico. Sono tre i geni strutturali deputati alla sintesi degli isoenzimi dell'ALP, placentare, intestinale ed epatico-ossea, essendo le altre "forme multimolecolari" dovute a sintesi post-genetica. La separazione elettroforetica è la tecnica che ci permette l'identificazione delle frazioni isoenzimatiche dell'ALP associando alla corsa del siero non trattato, la corsa del siero trattato con un inibitore differenziale (neuraminidasi, lectina). Allo scopo di automatizzare la metodica abbiamo confrontato il kit Hydragel ISOPAL su strumento semiautomatico per elettroforesi HYDRASIS (Sebia) con il sistema manuale Paragon (Beckman). Entrambi i metodi utilizzano come supporto il gel di agarosio. Per la separazione della frazione ossea da quella epatica il primo metodo utilizza la lectina che è applicata direttamente sulla lastrina di gel in corrispondenza della corsa del campione duplicato, mentre il secondo necessita di un'incubazione del siero in esame con neuraminidasi. Abbiamo effettuato prove di ripetibilità nella serie (5 campioni: CV compresi tra 1.5 e 6% per le varie frazioni) e tra giorni (5 campioni: media CV compresa tra 3.2 e 6.6% a seconda delle frazioni). Per le prove di accuratezza sono stati esaminati 120 pazienti afferenti al Centro della Menopausa della nostra A.O. e circa 30 bambini affetti da Fibrosi Cistica con epatopatia. In tutti i casi il paragone tra i valori densitometrici delle singole frazioni isoenzimatiche (ossea, epatica, biliare) ottenuti con i due metodi hanno dato risultati soddisfacenti con coefficienti di correlazione nell'ambito dello studio di regressione lineare rispettivamente di: 0.972, 0.991, 0.989. L'identificazione della frazione intestinale ha mostrato una maggior sensibilità del metodo SEBIA dovuta anche alla presenza di tre subfrazioni che possono essere analizzate singolarmente. Dai dati ottenuti appare interessante l'utilizzo del kit ISOPAL- SEBIA sia per la qualità del dato sia per l'automazione fornita.

*Bibliografia:*

Van Hoof VO: Improved agarose electrophoretic method for separating ALP isoenzymes in serum. Clin Chem. 1988,34,1857-1862

## ELASTASI FECALE E PANCREATITE CRONICA

Esposito C., Formicola V., Spanò A., Spina M.

La diagnostica della funzionalità pancreatica si avvale di test invasivi e non invasivi. Nella pratica clinica è importante procedere in primo luogo con mezzi non invasivi e tra questi un posto di rilievo, ha assunto negli ultimi anni, la determinazione dell'elastasi fecale. L'elastasi pancreatica è un enzima digestivo proteolitico prodotto nella parte esocrina del pancreas e che normalmente si concentra in elevate quantità nelle feci. Scopo della ricerca è stato quello di determinare le concentrazioni di tale enzima nelle feci di due gruppi di soggetti: il primo comprendente pazienti con sospetta insufficienza pancreatica e il secondo soggetti con normale funzionalità pancreatica, al fine di valutarne l'efficacia nella diagnostica delle pancreatiti croniche.

**Materiali e metodi.** Sono stati studiati 40 soggetti di età compresa tra 20 e 72 anni, di cui 18 con sospetto di insufficienza pancreatica e 22 controlli negativi per patologie digestive. La concentrazione di elastasi 1 è stata determinata con un test immunoenzimatico disponibile in commercio (Panel ef1 Eurospital). Per la raccolta e conservazione dei campioni fecali e per la successiva esecuzione dei tests, ci si è avvalsi delle indicazioni della metodica nonché delle esperienze di altri autori.(2,3).

**Risultati.** In tutti i soggetti di controllo i valori dell'elastasi fecale sono risultati normali mentre in 9 pazienti con sospetta insufficienza pancreatica (50,0%) sono stati riscontrati valori patologici. In 2 pazienti (11,1%) si sono avuti valori border-line mentre i rimanenti 7 (38,9%) presentavano valori normali.

**Conclusioni.** Attualmente la determinazione dell'elastasi fecale con metodica Elisa è un presidio di prima scelta nella diagnostica dell'insufficienza esocrina del pancreas. E' un test di facile e rapida esecuzione per il laboratorista con il vantaggio di non essere invasivo per il paziente.

*Bibliografia:*

- 1) Boeck W.G, Adler G, Gress T.M.: Pancreatic function tests: when to choose, what to use. Curr. Gastroent. Rep. (2001),3,95-100;
- 2) Carroccio A., Verghi F., Santini B., Lucidi V., Iacono G., Cavataio F., Soresi M., Ansaldi N., Castro M., Montalto G.: Diagnostic accuracy of fecal elastase 1 assay in patients with pancreatic maldigestion or intestinal malabsorption. Dig. Dis. and Sci. (2001),46,6,1335-1342;
- 3) Gullo L., Ventrucci M., Tomassetti P., Migliori M., Pezzilli R.: Fecal elastase 1 determination in chronic pancreatitis. Dig. Dis. and Sci. (1999),44,1,210-3

DEFINITION OF REFERENCE INTERVALS FOR PLASMA PROTEINS USING THE IFCC/BCR/CAP CERTIFIED REFERENCE MATERIAL CRM 470

Benati L., Klersy C\*, Balduini A., Bosoni T., Villani C., Pirolini L., Moratti R., Melzi d'Eril G.\*\*\*, Merlini G

Clin. Chem. Lab. & Biotech. Res. Lab., Dept. of Biochemistry, Univ. of Pavia, and \*Clin. Epidemiol. & Biometry Unit, IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia; \*\*Dept. of Exp. & Clin. Biomed. Sci., Univ. of Insubria

Use of the reference material, BCR/IFCC/CAP CRM 470, has resulted in significant changes in reference values for some proteins and therefore the introduction of new reference ranges for several of the 14 proteins, for which it is calibrated, is now urgently needed. A number of investigations with estimations of reference intervals based on CRM 470 have been published, but the estimated reference intervals are not consistent. This has led to a proposal for interim reference intervals based on a consensus of the published values, which is, however, only a temporary solution to the many problems. In order to investigate and estimate the real variation among human racial groups and according to environmental conditions, the IFCC Committee for Plasma Proteins (C-PP) issued a detailed protocol (1). The aim of the protocol is to establish a common basis for the production of reference values and well-defined and documented reference intervals for plasma proteins, based on common standardisation, using CRM 470. The IFCC C-PP commissioned our laboratory to define the reference intervals in a group of reference individuals from our geographical area (Southern Europe). This represents the first step of the complex process aimed at defining reference intervals.

The study was performed on 163 healthy male blood donors, 20 to 60 years of age, according to the IFCC C-PP protocol (1). Eleven plasma proteins were determined by immunonephelometry using the BN-II system (Dade Behring) following the analytical procedure recommended by the protocol. The criteria for selection of reference individuals, and for sample coagulation, transport, storage condition and thawing were strictly observed. The data were analysed according to the statistical models recommended.

The 95% reference limits (in g/L) are: transthyretin 0.2-0.35, albumin 37-51, alpha-1-acid glycoprotein 0.4-1.1, alpha-1-antitrypsin 0.9-1.4, haptoglobin 0.3-1.6, transferrin 1.7-3.1, ceruloplasmin 0.15-0.3, IgG 7-15, IgA 0.9-4.4, IgM 0.3-1.9 and C-reactive protein < 0.006.

The ranges overlapped those based on a consensus of the published values, with the exception of alpha-1-antitrypsin, transferrin and ceruloplasmin which showed a narrower range probably partly due to the gender of the population analyzed.

I. Petersen, P. H., Whicher, J. T., Johnson, A. M., Itoh, Y. & Carlstrom, A. B. (2001) *Clin. Chem. Lab Med.* 39, 1146-1153.

LA PROTEINURIA NEL PAZIENTE CON TRAPIANTO RENALE: RUOLO DEL PROFILO PROTEICO URINARIO

Muratore M.T\*, Neri C.\*, Carlini P.\*, Feriozzi S.^, Ranalli T°, Massimetti C.^, Carrozza R.\*

Laboratorio Analisi\*, Nefrologia e Dialisi^, Anatomia Patologica°, Ospedale Belcolle, Viterbo

Lo studio qualitativo della proteinuria (P) è stato ampiamente studiato nelle glomerulonefriti primitive. Al contrario lo è stato poco nei pazienti (pz) sottoposti a trapianto renale (PTR), nonostante sia presente in circa un terzo di essi, associandosi ad una prognosi negativa. Abbiamo eseguito uno studio qualitativo della proteinuria in 22 pz trapiantati in condizioni cliniche stabili con un sopravvivenza del trapianto > a 2 anni. Tutti i pz erano trattati con steroidi, immunosoppressori e inibitori del calcineurine. Le urine sono state esaminate ogni quattro mesi con tecniche standard di laboratorio al nefelometro (BNII-DADE\_BEHRING) usando acido tricloacetico al 20% per la P totale e antisieri specifici per il suo studio qualitativo: Albumina (Alb), Transferrina (Tfr), Ig G e alfa-2-macroglobulina ( $\alpha$ 2M) come proteine ad alto P.M., alfa 1 microglobulina ( $\alpha$ 1M) come proteina a basso P.M.; abbiamo raccolto questi esami sotto il nome di "profilo proteico urinario" (PPU). Per evitare la contaminazione batterica è stato analizzato il secondo campione di urina del mattino.

La P totale era assente in 16 PTR (<200 mg/L; G1), mentre la P totale era presente in 6 PTR (>200 mg/L; G2).

Altre proteine urinarie: Albumina (>20mg/L) era presente in 15 pz (9 G1 e 6 G2); Ig G (>8.5mg/L) in 8 pz (3 G1 e 5 G2);  $\alpha$ 2M (>2mg/L) in 4 pz (1 G1, 3 G2), Tfr (>1.9mg/L) in 9 pz (3 G1 e 6 G2),  $\alpha$ 1M (>12mg/L) in 11 pz (6 G1 e 4 G2). I risultati sono riportati in tabella espressi in mg/L (m  $\pm$  ES):

	Alb	IgG	$\alpha$ 2M	$\alpha$ 1M	Tfr
G1	36 $\pm$ 20	3.5 $\pm$ 2.5	0.3 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 10	1.2 $\pm$ 1
G2	123 $\pm$ 85	11.6 $\pm$ 11	1.1 $\pm$ 1.6	20.6 $\pm$ 15	4.8 $\pm$ 3.4

I gruppi erano simili per età (44 $\pm$ 4 G1 vs 46 $\pm$  5 G2 aa), durata del trapianto (7.5 $\pm$ 2 G1 vs 9 $\pm$ 4 G2 aa), creatininemia (1.4 $\pm$ 0.4 G1 vs 1.5 $\pm$ 0.4 mg/dl) e prevalenza di ipertensione arteriosa (11/16 G1 vs 5/6 G2). I nostri dati indicano che le proteine da cui è costituito il PPU sono quantitativamente associate con la P totale nei PTR ma, dato interessante, la microalbuminuria e l' $\alpha$ 1M sono significativamente presenti anche quando la P è assente. In questi pz la microalbuminuria potrebbe essere un marker di lesioni vascolari arteriosclerotiche del rene trapiantato, mentre l' $\alpha$ 1M potrebbe esserlo di danno tubulare. Perciò la P nei PTR è un problema complesso ed il PPU potrebbe essere un utile mezzo per valutare la funzionalità del trapianto.

## BLOOD ANTIOXIDATIVE MARKERS IN SPORADICALS PATIENTS

Bongioanni P.\*, Metelli M.R., Magoni M.\*, Panicucci E., Tararà M., Bozzi M., Rossi B.\*, Pietrini P.

Laboratory of Clinical Biochemistry, Dept. of Experimental Pathology \*Neurorehabilitation Unit Dept. of Neuroscience University of Pisa

Increasing evidence suggests that amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disorder resulting in motor neuron death, is associated with oxidative damage induced by free radicals.

In the present study, we assessed the blood oxidative stress status in 20 "de novo" ALS patients (age  $62 \pm 11$  (mean  $\pm$  SD) years), compared with 20 age-matched healthy control subjects (age  $56 \pm 9$  years). According to the El Escorial criteria, 11 patients had definite ALS, 9 probable ALS. We assayed the total plasma antioxidant content (TPAO), and blood Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) activities. We found significantly increased SOD activities in patients compared to controls ( $929.0 \pm 380.0$  (mean  $\pm$  SD) U/g Hb) for both definite ( $1418.9 \pm 495.8$  U/g Hb) and probable ( $1240.0 \pm 374.9$  U/g Hb) ALS patients ( $p=0.004$  and  $p=0.05$ , respectively); and significantly ( $p=0.04$ ) decreased GPX activities only in definite ALS patients as compared to controls ( $34.7 \pm 9.9$  U/g Hb vs  $44.8 \pm 14.9$  U/g Hb). No significant differences in GR activities and TPAO levels were observed between patients and controls, neither significant differences were noted in enzyme activities and TPAO values between the ALS patient subgroups. These findings confirm the presence of an oxidative stress in blood of ALS patients. Increased SOD activity might parallel the toxic gain of enzyme function reported as dangerous for motor neurons, and impaired GPX activity (already found also in ALS brains) might play a further part in the pathogenesis of the disease.

## ISOENZIMI DELL'LDH NEL PLASMA SEMINALE: FATTORE PROGNOSTICO IN CASO DI PROSTATITE CRONICARECIDIVANTE?

Grande R.<sup>1</sup>, Innocenti L.<sup>2</sup>, Longo D.G.<sup>1</sup>, Casella P.<sup>1</sup>, Colombi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, P.O. Vimercate (MI), Az. Osp. "Ospedale Civile" di Vimercate, Primario Dr. Lorenzo Prencipe

<sup>2</sup>Divisione di Urologia, P.O. Vimercate (MI), Az. Osp. "Ospedale Civile" di Vimercate, Primario Dr. Renzo Borin

Attualmente sono numerosi gli autori che hanno rivalutato lo studio delle frazioni isoenzimatiche dell'LDH nel campo della sterilità di coppia, utilizzando come parametro qualitativo e quantitativo la frazione LDH -C<sub>4</sub> (LDX), specifica della gonade maschile, come indice di valutazione del potenziale riproduttivo del paziente. Su questa base, in collaborazione con la Divisione di Urologia dell'Azienda Ospedale di Vimercate è stato eseguito su 100 pazienti provenienti dall'ambulatorio della medesima divisione, afferenti al nostro servizio per la valutazione morfologica e funzionale dei parametri seminali, lo studio delle frazioni enzimatiche dell'LDH su plasma seminale ottenuto dopo centrifugazione del campione a 3000rpm. La metodica scelta è stata l'elettroforesi su gel di agarosio (Hydragel 7 Iso LDH SEBIA®). Otto di questi pazienti hanno presentato un peculiare tracciato isoenzimatico caratterizzato da un innalzamento della frazione LDH 5 associato in tutti i soggetti, tranne uno, a leucospermia. L'ampiezza del picco non è associata alla quantità dei leucociti presenti. Di questi pazienti, uno era un follow up post intervento di resezione del collo uretrale, uno un follow up post intervento di varicocele, quattro erano controlli per prostatiti acute e due erano accertamenti per sterilità di coppia.

Di questi pazienti, tre sono stati monitorati dopo due mesi e di questi uno solo è stato monitorato dopo sei mesi e un anno. In due dei tre pazienti monitorati è risultata una diminuzione della leucospermia e un ritorno al normale pattern. Il terzo ha presentato una fluttuazione della frazione LDH 5 e LDX. Detto paziente è quello monitorato a sei mesi ed a un anno.

Conclusioni e discussione: la diagnosi di infezione delle ghiandole sessuali accessorie è attualmente formulata in modo prevalentemente sintomatico a causa, spesso, della negatività degli esami di laboratorio. A nostro avviso l'osservazione che segnaliamo merita un approfondimento di indagine per la possibilità di poterla correlare a questo tipo di patologie soprattutto come fattore prognostico nell'eventuale ricomparsa di sintomatologia nelle cosiddette "prostatiti recidivanti". Infatti, il 70% dei pazienti coinvolti presentava problemi di tipo prostatico.

LDH-C<sub>4</sub>: A Unique Target of Mammalian Spermatozoa-GS. Gupta- Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology: 36(4):361-385 (1999).

## RINORREA O RINOLIQUORREA? PROPOSTA DI UN METODO DIAGNOSTICO NON INVASIVO.

Vernocchi A., Ravasio R., Pelliccia D., Mangili L., Amboni P., Ottomano C.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche - Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedali Riuniti di Bergamo

La richiesta clinica per la distinzione tra rinorrea e rinoliquorrea è frequente in pazienti sottoposti a chirurgia transfenoidale, in pazienti con trauma della base cranica o sempre più frequentemente con rinoliquorrea spontanea. Poiché il dosaggio di glucosio e proteine nel secreto nasale non è specifico per porre una corretta diagnosi, proponiamo un metodo basato sulla identificazione della pre-Albumina liquorale e della Transferrina  $\beta_2$  (Tau) mediante immunofissazione su gel di agarosio adattata allo strumento Hydrasys (Sebia Italia) utilizzando Liquor come controllo "positivo" e siero opportunamente diluito come "negativo", al fine di identificare la presenza di Liquor (CSF). La Transferrina  $\beta_2$  (Tau) è una transferrina desialilata che è normalmente presente nel CSF e assente nella secrezione nasale, mentre la pre-Albumina è presente in tracce nella secrezione nasale e in maggiore concentrazione nel CSF e nel siero; all'immunofissazione abbiamo inoltre osservato che la pre-Albumina liquorale ha mobilità elettroforetica maggiore di quella sierica, pertanto la presenza di entrambe le proteine liquorali evidenzia inequivocabilmente la presenza di CSF nel secreto nasale.

Riteniamo che questo metodo, facilmente applicabile dal punto di vista analitico, è clinicamente molto efficace perché non sono disponibili altri test diagnostici strumentali non invasivi facilmente praticabili per la identificazione della rinoliquorrea post-chirurgica, post traumatica e spontanea. Abbiamo analizzato 30 casi clinici confrontando i risultati del test alla fluoresceina, che rappresenta il test (invasivo) di riferimento, con il metodo analitico basato sulla identificazione della pre-Albumina liquorale e della Transferrina  $\beta_2$  (Tau). La negatività e la positività del test alla fluoresceina sono state tutte sempre precedentemente confermate con il nostro metodo su secreto nasale.

## VALUTAZIONE DI DIFFERENTI SISTEMI DI DOSAGGIO DELL'ALBUMINA SERICA

Stocchi O., Bianchi G., Tiberi O.

Servizio di Laboratorio ASL N.2 URBINO (PU)

L'albumina è la proteina presente in maggior concentrazione nel siero, è sintetizzata dal fegato e svolge le funzioni di mantenimento della pressione colloidale osmotica e di carrier specifico per sostanze non idrosolubili.

Scopo di questo lavoro è la valutazione dell'attendibilità analitica del dosaggio dell'albumina serica con elettroforesi capillare e con dry chemistry e immunonefelometria. Mentre l'elettroforesi capillare è una tecnica separativa con risultati di tipo qualitativo, gli altri due sistemi comportano dosaggi di tipo quantitativo.

Il lavoro è stato condotto nel periodo settembre 2001 – marzo 2002 nell'U.O. Laboratorio Analisi dell'ASL 2 di Urbino. La selezione del campione è stata fatta "a posteriori" ed ha seguito il seguente diagramma di flusso:

esito elettroforesi → dosaggio dry chemistry → dosaggio immunonefelometrico. I sistemi analitici utilizzati sono stati: Elettroforesi Zonale Capillare Paragon CZE 2000 – Beckman; Vitros Ektachem 950 – Ortho Clinical Diagnostics; BNA 100- Dade Behring. Per la valutazione della affidabilità dei sistemi analitici sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: precisione, accuratezza, test di recupero, sensibilità, correlazione. A tale scopo sono stati utilizzati materiali di controllo del commercio (Liquichek 1 e 2 Biorad, N-Protein Standard SL Dade Behring) e 45 sieri di pazienti ospedalizzati.

Si sono ottenuti i seguenti risultati per i 2 livelli:

**Ripetibilità:** BNA: DS 0,17-0,10; CV% 4,49-4,13; Ektachem: DS 0,05-0,02; CV% 1,30-0,87; CZE: DS 0,05-1,63; CV% 1,69-1,63.

**Riproducibilità:** BNA: DS 0,20-0,20; CV% 4,90-7,48; Ektachem: DS 0,09-0,08; CV% 0,87-3,19; CZE: DS 0,10-0,13; CV% 3,40-5,76.

**Bias:** BNA 3,3%; Ektachem 3,97%; CZE 20,2%.

**Sensibilità:** BNA 0,38 g/dl; Ektachem 0,9g/dl.

**Linearità:** BNA 10y,6%; Ektachem 78,6%.

**Correlazione:** BNA vs Ektachem  $r=0,88$ ; BNA vs CZE  $r=0,88$ ; Ektachem vs CZE  $r=0,95$ .

Dallo studio clinico condotto sono emersi i seguenti risultati: **specificità clinica:** BNA 92%; Ektachem 100%; CZE 88%; **sensibilità clinica:** BNA 92%; Ektachem 100%; CZE 100%; **valore predittivo positivo:** BNA 92%; Ektachem 86%; CZE 67%.

Da questo studio si può concludere che il Sistema CZE può essere utilizzato come test di screening; l'Ektachem presenta indubbi vantaggi, e per la rapidità di risposta e per i costi, soprattutto per i valori intorno al range di normalità; il BNA ha dimostrato performance analitica superiore, ma richiede strumentazione dedicata ed a costi elevati.

NCCLS. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. NCCLS Document EP9-A. Wayne, PA: NCCLS; 1995.

VALORE PREDITTIVO NEGATIVO DELLA PROCALCITONINA (PCT) NEL MONITORAGGIO POST-OPERATORIO IN ASSENZA DI INFEZIONE.

Passerini R.°, Spaggiari L. \*, Tradati P. °, Roth M.T. °, Sandri M.T.°

°Divisione di Anatomia Patologica e Medicina di Laboratorio; \*Divisione di Chirurgia Toracica, Istituto Europeo di Oncologia - Milano

La Procalcitonina (PCT) è un marcatore di infezione batterica grave che, per le sue caratteristiche di specificità e per la sua stabilità in circolo, nell'ultimo decennio ha trovato utilizzo in diverse patologie. Una delle condizioni in cui il dosaggio della PCT può essere di valido supporto al clinico, è la diagnosi precoce di complicanze infettive post-operatorie. Infatti, come riportato in letteratura, la PCT non si innalza a seguito di interventi chirurgici, a meno di complicanze infettive gravi. In questo studio abbiamo voluto verificare il valore predittivo negativo della PCT, in assenza di complicanze infettive, in un gruppo di pazienti ricoverati nel nostro Istituto ed operati di pneumonectomia o lobectomia per l'asportazione di tumori primitivi o di metastasi. Nel periodo peri-operatorio (giorni -1, 0, +1 fino a +5 rispetto all'in-tervento) questi pazienti vengono di norma monitorati con il conteggio dei leucociti e la determinazione della PCR: a tali parametri è stato aggiunto il dosaggio della PCT. Nell'arco di due mesi abbiamo raccolto i dati relativi a 47 pazienti: il valore medio della PCT si è sempre mantenuto all'interno del range di normalità, con un picco in 2<sup>a</sup> giornata di 0.42 ng/ml (range 0.08-1.99; 10 i pazienti con valori >5.0) e un successivo costante calo dei valori: in 5<sup>a</sup> giornata il valore medio era di 0.24 ng/ml (range 0.08-0.60, solo un paziente con valore >0.5). I valori della PCR hanno mostrato un picco in 2<sup>a</sup> giornata con un valore medio di 141.80 mg/dl (range 20.04-365.83), ma in 5<sup>a</sup> giornata erano ancora molto elevati (valore medio 123.97 mg/dl, range 18.50-330.00), mentre il numero dei leucociti ha raggiunto il valore più elevato il giorno stesso dell'intervento (valore medio 13030/mmc, range 5520-20390), rientrando già in 2<sup>a</sup> giornata nei limiti di norma (valore medio 9400/mmc, range 4530-18400). L'analisi delle curve dei tre parametri evidenzia come, in assenza di complicanze infettive, PCT e numero di leucociti possano fornire una indicazione prognostica in tempi più ristretti rispetto alla PCR, marcatore di infezione largamente utilizzato nella routine per la sua elevata sensibilità, ma non altrettanto specifico: i suoi valori infatti, a seguito di grossi interventi, mostrano sempre un aumento che, in assenza di complicanze, può protrarsi anche oltre una settimana. Sulla base di questa nostra esperienza preliminare ci sentiamo quindi di poter confermare l'utilità del dosaggio della PCT, insieme ai parametri già in uso, nel monitoraggio peri-post-operatorio di pazienti a rischio di complicanze infettive.

- Di Filippo A. et al: Procalcitonin as an early marker of postoperative infectious complication. *Min Chir* 2002 Feb; 57(1):59-62

AMP AND MEG BUFFERS FOR ALKALINE PHOSPHATASE MEASUREMENT: EFFECTS ON HUMAN SAMPLES AND CONTROL MATERIALS

Ceriotti F.<sup>1,2</sup>, Bonora R.<sup>3</sup>, Guerra E.<sup>2</sup>, Ferrero C.A.<sup>2</sup>, Serena C.<sup>3</sup>, Carobene A.<sup>2</sup>, Panteghini M.<sup>3</sup> for the SIBioC Study Group on 'Enzymes'

<sup>1</sup>Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A., Milano

<sup>2</sup>Laboratorio Standardizzazione, Istituto Scientifico H. San Raffaele, Milano

<sup>3</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia

This study compares the effect of the modification of some analytical variables, i.e. pH, buffer concentration, NaCl concentration, and presence/absence of metal ion buffer, in two buffer systems previously recommended for ALP determination, i.e. amino-methyl-propanol (AMP) and N-methyl-glucamine (MEG), to test their robustness (1, 2). Analyses were repeated on the same samples in two laboratories using different automated analysers (Abbott Aeroset and Roche Hitachi 717) and experimental factors based on the molar absorption coefficient of the 4-nitrophenol to calculate results. Eight human serum pools (HSP) with different prevalence of ALP isoenzymes [normal (n=2), liver (n=2), bone (n=3), and placenta (n=1)] and 12 commercial control materials (CM) were tested. The effects of the variations of analytical conditions were evaluated by calculating the ratio of the results obtained in different conditions on HSP and CM. If CM ratio was within the  $\pm 3SD$  interval of the HSP results (excluding the placenta HSP), the CM was considered commutable in that particular condition. All variables had an effect on HSP which was different from that on most CM, showing commutability problems in these materials. However, while pH and NaCl variations produced the same effects with both buffers, variations of buffer concentration and absence of ion buffer caused minor problems with MEG. The majority of the evaluated CM were not commutable since they consist of ALP isoenzymes different from the pattern which is usually detected in cases of liver or bone diseases. In particular, the use of placental or intestinal ALP to spike CM should be discontinued by the manufacturers. Conversely, it would be desirable to use recombinant tissue non-specific ALP to prepare CM.

References:

1. Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21:731-48.
2. Ceriotti F, Ferrero C.A., Panteghini M., et al. SIBioC Commissione 04 Enzimi. Raccomandazioni per la determinazione della concentrazione dell'attività catalitica di cinque enzimi. *Biochim Clin* 1994; 18:447-62.

## DOSAGGIO DELLE Ig SIERICHE NELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI CON DUE SISTEMI NEFELOMETRICI

Mercurio S., Bruschetti A., Caldini A., Malesci P., Mosconi V., Ognibene A., Brogi M., Piazza E.

Laboratorio Centrale Analisi Biochimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

Le gammopatie monoclonali (GM) sono la conseguenza di una produzione anomala di un singolo clone di plasmacellule o linfociti B che può essere associata a patologie maligne quali il mieloma e l'amiloidosi AL. Va però notato che molte GM sono benigne, le cosiddette MGUS (GM di incerto significato). In entrambi i casi il follow-up di questi pazienti può prevedere la quantificazione della componente monoclonale (CM) che all'elettroforesi si presenta come una stretta banda di migrazione nella zona  $\gamma$ , ma spesso anche in zona  $\beta$ . Il metodo migliore per la quantificazione delle CM resta la densitometria che è però poco accurata per le CM di lieve entità o per quelle che migrano nella regione  $\beta$  sovrapponendosi ad altre proteine. A causa della sua eccellente riproducibilità e facilità d'uso la nefelometria viene spesso usata per la quantificazione delle CM, ma occorre tenere presente che le CM, a causa della loro peculiarità immunologica, possono reagire con gli antisieri in modo diverso rispetto ai calibratori con una conseguente sovrastima o sottostima della loro concentrazione. Scopo del presente lavoro è stato confrontare i risultati ottenuti in 58 pazienti con CM sieriche confermate da immunofissazione su agarosio utilizzando due nefelometri automatici (BNII Dade Behring e Delta Radim). I risultati ottenuti con entrambi i sistemi hanno mostrato una buona correlazione per tutte le classi di Ig (IgG  $r=0.972$ ; IgA  $r=0.956$ ; IgM  $r=0.985$ ). In nessuno dei 58 pazienti studiati si è verificato il mancato riconoscimento della Ig monoclonale da parte degli antisieri. Quando il tracciato elettroforetico lo consentiva (CM in zona gamma ben separabili dalle Ig policlonali, CM in zona beta presenti in quantità tale da rendere trascurabile il contributo delle altre proteine o migrate in zona beta) i risultati dei dosaggi sono stati anche confrontati con il dato densitometrico ( $n=44$ ): solo in 21 casi per il BNII e in 25 per il Delta, il dosaggio nefelometrico ha fornito risultati che non differivano di più del 20% dalla concentrazione ricavata dal tracciato elettroforetico. Questa discordanza può dipendere sia dal fatto che col metodo nefelometrico vengono misurate anche le Ig policlonali, che invece dal tracciato possono essere escluse, sia dalla possibile diversa immunoreattività delle CM. Sembra quindi consigliabile l'utilizzo della densitometria per la misura della concentrazione delle CM, limitandone l'uso a quei campioni i cui tracciati elettroforetici ne consentano il calcolo preciso.

## ASSESSMENT OF SIX METHODS FOR MEASUREMENT OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN SERUM AS DIAGNOSTIC TESTS OF SUCCINYLCHOLINE SENSITIVITY

Mosca A.,<sup>1</sup> Bonora R.,<sup>2</sup> Ceriotti F.,<sup>3</sup> Franzini C.,<sup>4</sup> Lando G.,<sup>5</sup> Patrosso M.C.,<sup>5</sup> Zaninotto M.,<sup>6</sup> Panteghini M.<sup>2</sup> for the SIBioC Study Group on 'Enzymes'

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, 20090 Segrate MI

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", 25125 Brescia

<sup>3</sup>Laboratorio Standardizzazione, Istituto Scientifico H. San Raffaele, 20132 Milano

<sup>4</sup>Istituto di Scienze Biomediche, Ospedale L. Sacco, Università degli Studi, 20157 Milano

<sup>5</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Patologia Clinica, Ospedale Niguarda Ca' Granda, 20162 Milano

<sup>6</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale, 35100 Padova

*Background:* No comparative information concerning the ability of various commercial cholinesterase (CHE) methods to identify succinylcholine-sensitive patients, purely on the basis of the enzyme activity recorded in the serum, are available. To this purpose, six different methods for the measurement of CHE activity were evaluated.

*Methods:* 131 subjects were subdivided according to CHE phenotype and, therefore, to succinylcholine sensitivity. CHE phenotype was determined by measuring dibucaine and fluoride numbers. DNA analysis was also performed to confirm appropriate correlation between the phenotype classification used in the study and the CHE genotype. The six evaluated CHE methods were performed in four laboratories using the same samples derived from the enrolled subjects.

*Results:* The tested methods were significantly different in their ability to discriminate between the subjects with and without succinylcholine-sensitive phenotypes. The succinylthiocholine / 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoate) (DTNB) method showed the highest accuracy [area under the ROC curve,  $0.97 \pm 0.014$ ], followed by the propionylthiocholine/DTNB method.

Conversely, the two methods using butyrylthiocholine as substrate and that employing benzoylcholine showed limited clinical utility in discriminating subjects at risk of prolonged apnea (area under the ROC curve  $\leq 0.9$ ). Using the succinylthiocholine method, a value  $\leq 23$  U/L was approximately five times as likely to occur in a sensitive individual as in a normal one.

*Conclusions:* The succinylthiocholine/DTNB assay is the method of choice in selecting the subjects prone to develop apnea after succinylcholine treatment on the basis of enzyme activity alone. We propose this analytical approach as the candidate reference method for standardization of CHE assays.

## NUOVE CONDIZIONI ANALITICHE PER LA ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE

Luraschi P., Franzini C.

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

La elettroforesi capillare zonale (CZE) consente stime attendibili delle 5 classiche "zone" elettroforetiche. I valori di riferimento per le 5 "zone" proteiche del siero (A;  $\alpha$ -1;  $\alpha$ -2;  $\beta$ ;  $\gamma$ ) misurabili con tale tecnica sono stati stabiliti per condizioni analitiche (old) precedentemente disponibili (Petrini C *et al.* Clin Chem Lab Med 1999; 37:975-80). Recentemente sono state rese disponibili nuove condizioni analitiche (new), per una più attendibile rivelazione di componenti monoclonali. In questo lavoro si sono stabiliti i rapporti (new/old) al fine di definire nuovi valori di riferimento. Sono stati analizzati 119 campioni di siero in parallelo con le due condizioni sul medesimo strumento (Paragon CZE 2000, Beckman Coulter). Sulla base del rapporto old/new, per ciascuna zona si è selezionato il 95% centrale dei campioni (n=113). Per i valori misurati in tale gruppo-campione (espressi come % delle proteine totali) si è calcolata la regressione lineare old/new (componente principale standardizzata), con i seguenti risultati. A:  $y=0,62+0,97x$ ;  $\alpha$ -1:  $y=0,34+1,02x$ ;  $\alpha$ -2:  $y=2,57+1,00x$ ;  $\beta$ :  $y=0,34+0,87x$ ;  $\gamma$ :  $x=-0,74+1,00x$ . Tali equazioni possono essere applicate a gruppi di valori di riferimento ottenuti con le "vecchie" condizioni analitiche, ricavando i corrispondenti valori per le "nuove". Per esempio, applicandole ai valori di riferimento "vecchi" su menzionati (espressi in % delle proteine totali) si sono calcolati i "nuovi" valori di riferimento, osservando le seguenti variazioni A: da 53,3-70,5 a 52,3-69,0;  $\alpha$ -1: da 4,4-9,3 a 4,8-9,8;  $\alpha$ -2: da 6,4-9,0 a 10,3-12,9;  $\beta$ : da 6,7-10,6 a 6,2-9,6;  $\gamma$ : da 11,0-16,8 a 10,3-16,1. Il grado di confidenza sulla attendibilità della correzione matematica applicata risulta dalla "bontà" dell'adattamento delle rette di regressione ai singoli punti, rilevabile graficamente e documentata statisticamente dai valori elevati del coefficiente di correlazione (r, da 0,955 a 0,990 per le cinque zone), nonché dai valori contenuti di  $Sy/x$  (1,03 per A e da 0,49 a 0,99 per le quattro zone globuliniche). Contribuiscono alla affidabilità del procedimento la numerosità del gruppo-campione e la ampiezza dell'intervallo dei valori di concentrazione (rapporto massimo /minimo da 2,3 a 9,7 per le differenti zone), risultante dalla inclusione nel gruppo di sieri da portatori di differenti patologie. In sintesi si è osservato: variazione maggiore (aumento) per la zona  $\alpha$ -2; variazioni medie (diminuzione) per le zone  $\beta$  e  $\gamma$ ; variazioni trascurabili (rispettivamente diminuzione ed aumento) per le zone A ed  $\alpha$ -1. Dati preliminari indicherebbero che tali variazioni siano prevalentemente dovute a diversa distribuzione di frazioni lipoproteiche. Sembra comunque raccomandabile che i "nuovi" valori di riferimento siano considerati per le analisi elettroforetiche effettuate con tecnica CZE impiegando le nuove condizioni analitiche.

## ROLE OF GST P1-1 IN MEDIATING THE EFFECT OF ETOPOSIDE ON HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE SH-SY5Y

<sup>1,2</sup>Bernardini S., <sup>1</sup>Bellincampi L., <sup>1</sup>Ballerini S., <sup>1</sup>Diano L., <sup>1</sup>Renzi S., <sup>3</sup>Ranalli M., <sup>1</sup>Cortese C., <sup>1,2</sup>Federici G

<sup>1</sup>Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Rome, Italy. <sup>2</sup>Clinical Biochemistry Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome, Italy. <sup>3</sup>Biochemistry Laboratory IDI-IRCCS c/o Dept. of Experimental Medicine, Univ. of Tor Vergata, Rome, Italy

Glutathione transferases (GSTs) play an important role in the protection of cells from the products of oxidative stress as well as from several environmental carcinogens. Particular interest has been focused on the GST P1-1 class because this gene class is up-regulated during the early stage of oncogenesis and is significantly overexpressed in many human tumors. It has also been shown that high levels of GST P1-1 expression are associated directly with tumor drug resistance and with poor patient survival.

The oxidative stress could have a dual action on GSTP1-1 metabolism: transcriptional induction and/or polymerization (1). The former should represent a form of adaptation to oxidative stress and contribute to protect the cell, the latter one should activate apoptosis via c-Jun N-terminal Kinase (JNK).

We studied the effect of etoposide on human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and on an etoposide-resistance clone to investigate whether a pleiotropic effect of etoposide on the redox status of the cell exists which is able to interfere with apoptosis through the GSTP1-1 system.

Etoposide treatment was able to induce GSTP1-1 polymerization and activation of apoptosis. The data obtained from our etoposide resistant clone and the possibility to reverse the sensitive phenotype to a resistant one by means of hexyl-glutathione preincubation, seem to suggest that cellular levels of GSH have a key role in protecting GSTP1-1 by oxidation and consequently the cell's decision between life and death.

1) Hayes J and McLellan LI. *Free Rad Res* (1999), 31:273.

PIVKA II E PROTEIN-C (PC : AG) IN PAZIENTI CON EPATOCARCINOMA, CIRROSI ED EPATITE CRONICA: CORRELAZIONE CON L'αFP

Coviello M., Daniele A., Abbate I., Venneri M.T., Maci R., Quaranta M.

Dipartimento di Oncologia Sperimentale, U.O. Laboratorio Analisi, I.R.C.C.S. Ospedale Oncologico, BARI

SCOPO: La Des Gamma Carbossi- Protrombina (DCP) denominata PIVKA II (Protein induced by vitamin K absence or antagonist) e la Protein C (PC: Ag), una proteina plasmatica vitamina K dipendente sintetizzata dal fegato, possono essere considerate marcatori prognostici complementari alla αFP nella diagnosi di carcinoma epatocellulare (HCC). Obiettivo di questo studio è stato quello di verificare il significato clinico-patologico del PIVKA II e della Protein C e l'eventuale loro correlazione con l'Alfafetoproteina (αFP) in pazienti con carcinoma epatocellulare (HCC), cirrosi epatica (LC) ed epatite cronica (CH).

PAZIENTI E METODI: Sono stati arruolati 35 pazienti HCV positivi di cui 20 con CH, 8 con LC 7 con HCC e 20 soggetti sani utilizzati come controllo negativo. Ognuno di essi è stato sottoposto a routine emato-clinica, ecografia e biopsia epatica; successivamente sono stati dosati i livelli plasmatici di PIVKA II (Asserachrom PIVKA- II Enzyme Immunoassay- ditta STAGO) e della Protein C (PC:Ag) Enzyme Immunoassay – Ditta IL) e il livello sierico dell'αFP (Test in Chemiluminescenza – IMMULITE 2000 – Ditta Medical System).

RESULTS: I nostri risultati preliminari hanno evidenziato in 7/7 (100%) dei pazienti con HCC una concentrazione plasmatica del PIVKA-II con valore medio di 104±55ng/ml; in 3/8 (37%) dei pazienti affetti da LC la concentrazione media è stata di 35±47.9ng/ml; in 20/20 pazienti (100%) con CH e nei 20/20 (100%) soggetti del gruppo di controllo la concentrazione plasmatica del PIVKA II è stata 0ng/ml. Per ciò che riguarda la Protein C, nei 7/7 (100%) pazienti con HCC i valori medi sono stati di 58±21%; in quelli affetti da cirrosi 8/8 (100%) sono stati pari a 47±15%; nei pazienti 20/20 (100%) con CH 77±23% e nel gruppo di controllo costituito da 20 pazienti sani i valori sono stati pari a 100±12%. Infine i dosaggi effettuati su siero dell'αFP hanno dato i seguenti valori medi: 535±1131ng/ml in 4/7 (57%) dei pazienti con HCC; 16±12ng/ml in 4/8 (50%) pazienti con cirrosi epatica; 2.38±2.3ng/ml nei 20/20 (100%) dei pazienti con epatopatia cronica mentre nel gruppo di controllo i valori medi riscontrati sono stati 1,7±0,3ng/ml. Inoltre non è stata evidenziata alcuna correlazione significativa tra PIVKA –II, Protein C e αFP (p= ns).

CONCLUSIONI: Dall'analisi di questi primi risultati il PIVKA II sembra discriminare meglio di altri tumor markers le patologie non neoplastiche rispetto alle patologie maligne; i casi di cirrosi che presentavano valori di PIVKA –II aumentati sono gli stessi che presentavano all'analisi istologica una spiccata differenziazione verso l'HCC. Tali risultati sia pur preliminari, suggeriscono l'utilizzazione di tale marcatore nello screening dell'epatocarcinoma in quanto i livelli plasmatici elevati del PIVKA-II correlano in maniera significativa con la trasformazione maligna dell'epatopatia cronica.

ESPRESSIONE TISSUTALE E SIERICA DELLA PROTEINA c-ERBb-2 NEL CARCINOMA MAMMARIO: UNA POSSIBILE CORRELAZIONE

Quaranta M., Coviello M., Venneri M.T., Labriola A., Simone G., D'Errico D., Marzullo F.

U.O. Analisi Chimico-Cliniche, U.O. Anatomia Patologica, Ospedale Oncologico I.R.C.C.S., Bari

L'oncogene c-erbB-2 (HER 2/neu) codifica per una glicoproteina di membrana, la p105, dotata di attività tirosin-chinasica nel suo dominio citoplasmatico (ECD). L'espressione della proteina c-erbB-2 può essere determinata sia negli estratti tissutali mediante metodica di immunohistochimica (Hercep test- Dako) sia nel siero con il dosaggio, mediante metodica di immunoenzimatica, del dominio extracellulare della proteina p105 (Human neu oncoprotein- test ELISA, Oncogene Science). Entrambe le determinazioni evidenziano il medesimo sito recettoriale. Inoltre la determinazione dell'espressione dell'oncogene neu nel tessuto del tumore è considerata una tappa obbligatoria per la selezione delle pazienti da sottoporre a trattamento con Herceptin (trastuzumab). Scopo di questo studio è verificare l'eventuale correlazione tra espressione tissutale e sierica del prodotto genico dell'oncogene c-erbB-2 (la glicoproteina di membrana p 105). La ricerca è stata condotta in maniera retrospettiva su 280 donne sottoposte ad intervento chirurgico per carcinoma mammario da cui sono stati ottenuti 280 campioni di siero e 114 sezioni di tessuto provenienti da materiale fissato in formalina e incluse in paraffina. In rapporto allo stato di metastatizzazione ascellare le pazienti sono state classificate in due sottogruppi: quelle con linfonodi positivi N+ (77/114) e quelle con linfonodi negativi N- (37/114). I nostri risultati preliminari dimostrano l'assenza di una correlazione diretta tra l'espressione del marker tissutale e quello circolante. Infatti, in accordo con l'analisi statistica eseguita mediante il test di McNemar, abbiamo ottenuto nel sottogruppo N+ il 26% (20/77) di concordi positivi, il 38% (29/77) di concordi negativi e il 36% (28/77) di discordanti con  $\chi^2 = 2,89$  e  $p < 0.089$ . Nel sottogruppo N- abbiamo ottenuto il 3% (1/37) di concordi positivi, il 48% (18/37) di concordi negativi e il 48% (18/37) di discordanti con  $\chi^2 = 2,72$  e  $p < 0.099$ . L'assenza di una significativa correlazione tessuto/sangue dimostra che il dosaggio sierico del dominio extracellulare della p105 non può essere utilizzato per il monitoraggio della risposta alla chemioterapia, per il follow-up e per la valutazione della prognosi del carcinoma mammario e quindi i livelli ematici della p105 non rappresentano, a tutt'oggi, una valida alternativa alla metodica immunohistochimica.

Riferimento bibliografico:

Kokochi Sugano, Mineko Ushiana, Takashi Fukutomi, Hitoshi Tsuda, Takashi Kitoh and Hisanao Ohkura. Int. J. Cancer(Pred. Oncol.):89, 329-336 (2000). Combined measurement of the c-erbB-2 protein in breast carcinoma tissue and sera is useful as a sensitive tumor marker for monitoring tumor relapse.

## SIGNIFICATO DELLA RICERCA E DEL TITOLO DI HbcAb E HbsAb PER LA PREVENZIONE DELL'EPATITE B POST-TRASFUSIONALE

Calosso L., Cornagliotto G., Ghiazza P., Marinoni R., Ricotti M., Palazzo M., Lupo M., Garofalo A., Tea B., Massaro A.L.

### Introduzione:

L'epatite B è l'infezione virale con il più alto rischio di trasmissione post-trasfusionale sebbene la ricerca dell'antigene HbsAg sia stato il primo screening introdotto. I pazienti affetti da epatite B possono guarire e, al contrario di quelli affetti da epatite C, essere di nuovo accettati come donatori di sangue. Sono stati riportati dei casi di trasmissione di HBV in seguito a trapianto di fegato da donatore HbsAg negativo, HbcAb IgG positivo. In base a queste considerazioni abbiamo cercato di capire se la trasfusione di unità di sangue HbcAb positivo sia sicura. Vista la mancanza di linee guida nazionali o internazionali, la Regione Piemonte ha stabilito un protocollo di valutazione locale che prevede la valutazione dei titoli di HbcAb e HbsAb prima di decidere la destinazione per uso clinico dell'unità di sangue.

### Metodi:

Lo screening per HbsAg è stato eseguito con il sistema Abbot PRISM. Ogni volta che un'unità di sangue HbsAg negativa era accompagnata dalla richiesta di un marker addizionale per l'epatite B (in seguito all'accettazione medica del donatore), venivano eseguite la ricerca e la titolazione di HbsAb e HbcAb con i kit Axym Ausab e Core. Le unità erano considerate valide quando il titolo di HbcAb era  $<1/400$  e quello di HbsAb  $>10$  mUI/mL oppure HbcAb  $>1/400$  e HbsAb  $>100$  mUI/mL.

### Risultati:

Nel 2001 sono stati eseguiti 149 test per HbcAb su donazioni di sangue: 48 erano inclusi nel profilo marker di unità risultate positive o borderline allo screening, 111 erano state richieste all'accettazione medica. Tra queste ultime 52 sono risultate HbcAb negative e 49 positive. 41 delle positive sono state validate perché avevano un titolo protettivo di HbsAb e 8 sono state scartate (4 perché erano negative per HbsAb, 2 perché il titolo HbsAb era  $<10$  mUI/mL, 2 perché non era ancora trascorso un anno dall'ultima reattività per HbsAg). Non ci è pervenuta nessuna denuncia di trasmissione di HBV in seguito all'impiego di tali unità.

### Conclusioni:

Uno dei principali obiettivi del Centro Trasfusionale è garantire la sicurezza del prodotto. Sebbene il sistema sanitario non rimborsi il costo delle titolazioni, la nostra esperienza suggerisce che l'esecuzione di questi test renda il sangue più sicuro.

### Bibliografia:

Schreiber GB et al. The risk of transfusion transmitted viral infection. *New Engl J Med*, 334,1685,1996.

## IL SESSO FETALE PUO' INFLUENZARE LA STIMA DEL RISCHIO DI SINDROME DI DOWN NEL PRIMO TRIMESTRE DI GRAVIDANZA?

Canini S.<sup>1</sup>, Marchese N.<sup>1</sup>, Prefumo F.<sup>2</sup>, Venturini P.<sup>2</sup>, Bisi M.<sup>1</sup>, De Biasio P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia;  
<sup>2</sup>U.O. di Ostetricia e Ginecologia, IRCCS "G.Gaslini", Genova

Il "test combinato" per la stima del rischio di sindrome di Down nel primo trimestre di gravidanza si basa sulla misurazione ecografica della translucenza nucale (NT) e sul dosaggio nel siero materno della proteina plasmatica A associata alla gravidanza (PAPP-A) e della subunità  $\beta$  libera della hCG (free  $\beta$ ). Tale screening, che permette una identificazione precoce della gravidanza a rischio di cromosomopatia, si sta ampiamente diffondendo. L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare se il sesso fetale può influenzare i livelli dei marcatori utilizzati e se ciò può avere effetto sulle prestazioni del test stesso. A tale scopo sono state studiate 645 gravidanze singole senza complicanze, che hanno portato alla nascita di un neonato normale e di sesso noto, fra la popolazione a basso rischio sottoposta nel nostro centro al "test combinato" nel periodo compreso fra novembre 1999 e settembre 2001. La datazione delle gravidanze e la misurazione della NT è stata eseguita mediante ecografia transaddominale. I due marcatori biochimici sono stati dosati mediante metodi IRMA (Ortho-Clinical Diagnostic, Amersham, UK). Il rischio è stato stimato utilizzando il software "Alpha" (Logical Medical Systems, UK). Dalle gravidanze considerate sono nati 344 maschi e 301 femmine. L'età media delle gravide al parto (31 anni), l'epoca gestazionale media di esecuzione del test (12 settimane) e il peso materno non differivano fra i due gruppi. I livelli dei marcatori espressi come multipli di mediana (MoM) e corretti, nel caso dei parametri biochimici, per il peso materno e il rischio stimato di sindrome di Down sono stati confrontati fra i due gruppi con test non parametrici (test di Mann-Whitney e di Kolmogorov-Smirnov). Non sono risultati statisticamente diversi i livelli di NT e PAPP-A, mentre una differenza significativa hanno mostrato i livelli di free  $\beta$  ( $p=0,0003$ ). I MoM di tale marcatore sono apparsi più elevati nelle gravidanze con feto di sesso femminile. Il rischio stimato di sindrome di Down è risultato mediamente 1 su 14000 nelle gravide con feto maschio e 1 su 13000 in quelle con feto femmina, ma la differenza non è risultata significativa ( $p=0,2$ ). I dati preliminari del nostro studio confermano quelli di Yaron e coll. e sembrano indicare che i MoM di free  $\beta$  più elevati nelle gravidanze con feto di sesso femminile non influenzino significativamente la stima del rischio di sindrome di Down e quindi le prestazioni del "test combinato".

Yaron Y. e coll. Effect of fetal gender on first trimester markers and on Down syndrome screening. *Prenat Diagn* 2001;21: 1027-1030.

## TESTING CELIACHIA PER PATOLOGIE NEUROLOGICHE – RISULTATI PRELIMINARI

Falliti G., Di Pietro R., Antoci F., Cardella M.R.

Servizio di Patologia Clinica - Ospedale di Mistretta Via  
Anna Salamone 99, 98073 Mistretta (ME)

**Introduzione.** La Celiachia è una condizione di intolleranza alimentare permanente al glutine, che si instaura in soggetti geneticamente predisposti. La variabilità di presentazione sintomatologica rende difficile la diagnosi e, addirittura, il sospetto clinico. L'utilizzo di specifici e sensibili esami di laboratorio, Ab anti-transglutaminasi, ha semplificato l'iter diagnostico. Scopi. Il progetto di Testing per identificare l'associazione della Celiachia con patologie neurologiche ha gli obiettivi di: a) identificare i pazienti affetti da Celiachia tra soggetti affetti da patologie selezionate; b) specificare le sintomatologie più significative degli eventuali casi identificati; c) riduzione delle cure improprie, identificando i casi sottostimati. Le manifestazioni cliniche neurologiche più frequentemente associate alla Celiachia sono: S. atassiche, Epilessia con calcificazioni occipitali, Calcificazioni intracraniche non periventricolari, Disturbi del comportamento, Neuropatie periferiche, Demenza precoce, Patologia neurologica mal definita, Emicrania cronica, Sindrome tensione-fatica, Miastenia grave. **Materiali e Metodi.** Il progetto di Testing è condotto su pazienti del Centro Neurolesi della U.S.L. 5 di Messina. Ai pazienti ricoverati sono dosati: - Ab anti-Transglutaminasi di classe IgA (tTG-A) con metodo ELISA in micropiastra (Ditta Medic); - Anticorpi anti-Endomisio di classe IgA (EMA) con metodo IFI (Ditta Medic), su sezioni di Esofago di scimmia, solo se risultati positivi al test tTG-A o con soglia D.O. vicina al cut off. Risultati preliminari: Sono stati testati 86 soggetti (Sclerosi Multipla, SLA, M. di Parkinson, S. Depressive, Cefalea, Vasculopatie cerebrali, M. di Addison, Epilessia, S. di Tolosa-Hunt, Disturbi comportamento, M. di Alzheimer, S. fatica cronica). **Conclusioni.** Sono stati diagnosticati 3 casi di Celiachia, con conferma biotica endoscopica, che rappresentano il 3% del campione di pazienti testati. I risultati mostrano che, nonostante il piccolo campione di casi testati, si può ritenere di aver centrato in soli 7 mesi alcuni degli obiettivi prefissati: 1) l'utilità del Testing per via della facilità di esecuzione del Test anti-Transglutaminasi; 2) la risoluzione di casi clinici complessi; 3) l'eventuale indicazione alla revisione del protocollo d'indagine della Celiachia con la riduzione di test invasivi. Il nostro progetto di Testing si presenta come un efficace algoritmo diagnostico nel caso di soggetti affetti da gruppi di patologie selezionate. Si ipotizza che i progetti di Testing possano dare risposte certe sul rapporto costo/efficacia dei programmi di Screening.

**Bibliografia.** Ciacci C (2000). Lo screening della celiachia: le ragioni del medico dell'adulto. *Medico e Bambino* 19, 26-28. Sblattero D, et al (2000). Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 95, 1253-1257

## VALUTAZIONE DI UN METODO DI SCREENING PER LA TIPIZZAZIONE DELLA PROTEINURIA

Lanfranco G., Gai M., Jeantet A., Malfi B., Piccoli G.B., Segoloni G.P.

Cattedra di Nefrologia, Ospedale Molinette – Torino.

Alterazioni anatomofunzionali del filtro glomerulare determinano un aumento della escrezione di proteine con p.m. >67 kD, queste proteinurie glomerulari vengono ulteriormente distinte in selettive (presenza di albumina e transferrina) e non selettive (presenza di proteine di p.m. >100 kD). Alterazioni funzionali dei tubuli determinano la comparsa nelle urine di proteine con un p.m. <50 kD. Nell'ambito dei quadri misti di danno glomerulare e tubulare è importante valutare la presenza di proteine tubulari a p.m. <23 kD, che sono associate ad una più alta probabilità di insufficienza renale cronica. Scopo del nostro lavoro è il confronto dell'analisi di 80 campioni consecutivi di urine native, pervenuti al nostro laboratorio per la tipizzazione della proteinuria, condotta con due metodiche: elettroforesi in SDS-AGE (KIT HYDRAGEL PROTEINURIE, SEBIA Italia srl, Firenze) e immunofissazione su piastra (CSI – NEFRO, BIOCI, Airasca, Torino). Nell' SDS-AGE le proteine urinarie in presenza del detergente anionico sodiododecilsolfato (SDS), in eccesso, vengono separate in base al loro peso molecolare mediante una elettroforesi su gel di agarosio ad alta concentrazione. Il CSI – NEFRO caratterizza la proteinuria mediante l'impiego di 6 antisieri specifici per: proteina legante il retinolo,  $\alpha 1$  microglobulina, albumina, transferrina, IgG,  $\alpha 2$  macroglobulina. La sensibilità degli anticorpi ed i tempi di incubazione sono standardizzati per ottenere un immunoprecipitato quando le proteine ricercate sono presenti nelle urine native in quantità superiore alla concentrazione fisiologica. In base alla presenza/assenza di nefropatia ed alla sua classificazione, l'interpretazione del tracciato elettroforetico in SDS e quello della tecnica di immunoprecipitazione su piastra è stata identica in 143 casi (89.4%); nei 17 casi rimanenti (10.6%) entrambi i sistemi hanno consentito di rilevare correttamente una proteinuria patologica, ma di classificarla in modo diverso: in tutti i 17 casi si aveva una ridotta sensibilità della tecnica SDS – AGE nei confronti della proteinuria di tipo tubulare: in particolare 8 proteinurie miste incomplete con la tecnica CSI – NEFRO venivano classificate come glomerulari non selettive dalla SDS – AGE; 9 proteinurie tubulari complete, sia nella forma pura che in quella mista con CSI – NEFRO venivano viste come tubulari incomplete dalla elettroforesi in SDS – AGE. La metodica di immunoprecipitazione CSI – NEFRO è quindi superiore alla tecnica SDS – AGE nel valutare le proteinurie tubulari, i risultati sono ottenibili in meno di 4 ore, ad un basso costo (4 EURO/test su piastre da 5 test).

Regeniter A, Siede WH, Seiffert UB. Computer assisted interpretation of laboratory test data with "MDI-LabLink". *Clin Chem Acta* 1996; 248: 106-118.

## ANTI-TISSUE TRANSGLUTAMINASE IgA (tTGA) AND ANTI-ENDOMYSIAL IgA ANTI-BODIES (EmA) IN COELIAC DISEASE (CD)

Antonacci M., Casparrini G.

Clinical Laboratory, "Casa Sollievo della Sofferenza" Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG, Italy).

### Background:

The antigenic target of EmA has recently been identified as the tissue transglutaminase (t-TG). Aim of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of t-TGA in comparison with EmA in patients with CD, before and after gluten withdrawal, and controls.

### Patients and Methods:

We tested sera from 113 subjects sorted into 4 groups: group A (30 CD patients before gluten withdrawal with positive EmA); group B (14 CD patients on gluten free diet (GFD) with weakly positive EmA); group C (9 CD patients on GFD with negative EmA); and group D (60 healthy subjects or patients affected by gastrointestinal diseases other than CD, with negative EmA). EmA were detected by immunofluorescence (IFL) using the lower third of monkey oesophagus as substrate. t-TGA were assayed by ELISA.

### Results:

In group A 30/30 had a positive t-TGA test. In group B, 10/14 had a positive t-TGA test and 4/14 a borderline result. In group C, 7/9 tested negative while 2/9 was weakly positive. Finally, in group D, 49/60 tested negative, 4/60 were weakly positive and 7/60 showed borderline values. When the results from group A were compared with those from group D, a significant difference ( $p < 0.001$ ) emerged without overlap between the two groups.

### Conclusions:

Our findings show a good correlation between EmA and t-TGA. Subjects with negative EmA and weakly positive t-TGA should be followed up to determine whether t-TGA are falsely positive or significant for an initial form of CD.

## CELIACHIA NEGLI ADULTI: UN'ESPERIENZA DI COLLABORAZIONE TRA OSPEDALE E TERRITORIO

Spagnuolo S.<sup>o</sup>, Dente B.<sup>o</sup>, De Cristofaro V.<sup>o</sup>, Napoli L.<sup>^</sup>, Orefice E.<sup>o</sup>, Orefice S.<sup>o</sup>, Romano V.<sup>o</sup>, Saffiotti O.\*<sup>o</sup>, Troise G.#

<sup>o</sup>Laboratorio Patologia Clinica, \*Gastroenterologia endoscopica, #U.O. Medicina Interna, Ospedale S. Paolo, ASL I, Napoli, <sup>^</sup>Co.Me.Gen.

**Introduzione.** La malattia celiaca (MC) non è più considerata una patologia d'interesse esclusivamente pediatrico, corredata dai sintomi tipici di diarrea cronica con malassorbimento e ritardo della crescita. Sono sempre più frequenti forme più sfumate, che, non riconosciute in età infantile, perdendo, nell'adulto, le caratteristiche peculiari, assumono una gamma varia e insospettabile di sintomi e patologie associate.

**Obiettivo:** Identificare i soggetti affetti da MC all'interno di una coorte di pazienti adulti sintomatici, che trovino giovamento da tale diagnosi.

**Materiali e metodi.** Nello studio, ancora in fase iniziale, un gruppo di medici di base del ns. territorio e l' U.O. di Medicina Interna del ns. ospedale stanno reclutando i pazienti, secondo criteri che prevedono l'evidenza di almeno uno dei sintomi e/o segni e/o patologie, annoverati in una tabella concordata preliminarmente.

Nel ns. Laboratorio di Patologia Clinica i sieri dei pazienti immessi nello studio sono sottoposti ad un profilo ematochimico prestabilito. Esso prevede esami correlati ad eventuali sintomi extraintestinali e a patologie associate alla MC, quali l'emocromo, con profilo ematico marziale (sideremia, ferritinemia, transferrinemia), immunoglobuline sieriche, transaminasi, indici reumatici, autoanticorpi sistemici ed organo-specifici.

La diagnosi sierologica di MC è effettuata mediante la determinazione della transglutaminasi tissutale umana (ELISA, Eurospital) e degli anticorpi antiendomysio (Immunofluorescenza, DALTEC).

Il paziente, se positivo alla sierologia, riceve diagnosi definitiva dall'esame endoscopico, presso il settore di Gastroenterologia endoscopica.

**Risultati.** Considerando di trovarci ancora in una fase iniziale, in circa due mesi sono stati considerati 16 pazienti (M=4; F=12). L'età media è di 31 anni (range: 15-59). Sono risultati 5 positivi alla diagnosi di MC (sierologica ed istologica) e 11 negativi. I sintomi spia maggiormente correlati sono stati: calo ponderale, anemia ferropiva e dolore addominale.

**Conclusioni.** Attraverso l'interscambio formativo tra territorio e ospedale, è positivo aver individuato un percorso facilitato per la diagnosi differenziale in pazienti, che trovino beneficio dall'identificazione della MC e della sua cura.

**Bibliografia.** Tommasini A., Marzari R., Ventura A.: Malattia celiaca: tra passato e futuro. Prosp. in ped. Gastroenterologia 29, 181-196, 1999.

## L'UTILIZZO DELL'ANALISI CITOFUORIMETRICA DELLE URINE PER LO SCREENING DELLE BATTERIURIE

Amboni P., Alessio MG, Maestroni C., Radaelli A., Bertuletti A., Noris F., Benedetti T., Merlo G., Perego E., Ottomano C.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Dipartimento di Patologia Clinica. Ospedali Riuniti di Bergamo, Azienda Ospedaliera

L'uso frequente dell'esame "completo" delle urine come screening per la valutazione di sospette infezioni delle vie urinarie, e l'attuale possibilità di effettuare l'esame del sedimento mediante tecnica citofluorimetrica consente di verificare la possibilità di predire l'esito dell'urinocoltura utilizzando i dati ottenuti dall'esame citofluorimetrico. Di 8007 pazienti sono stati studiati l'esame citofluorimetrico e l'urinocolture rilevando i seguenti parametri:

- il numero dei leucociti (LEU)
- il numero dei batteri (BAT1 batteri con diametro >2 micron, BAT2 batteri con diametro < 2 micron)
- l'età del paziente
- il sesso del paziente (M maschio, F femmina).

L'esito dell'urinocoltura considerato positivo se > 100.000 UFC/ml da singolo battere.

E' stata effettuata l'analisi univariata (regressione logistica) per ciascuna delle variabili prese in considerazione utilizzando l'esito dell'urinocoltura come variabile indipendente discriminante.

Tutti i modelli così costruiti sono risultati significativi ( $p < 0,01$ ). E' stata effettuata poi un'analisi multivariata mediante una regressione logistica "stepwise" costruendo 2 modelli a 4 variabili tenendo la variabile sesso come discriminante. I due modelli così ottenuti sono risultati significativi ( $p < 0,01$ ) con una perdita minore rispetto a ciascun modello dell'analisi univariata.

Conclusioni: Per raggiungere gli obiettivi della ricerca, risulta quindi proponibile utilizzare il modello di regressione multipla con il quale si ottiene la probabilità di avere esito positivo dell'urinocoltura in funzione di BAT1, BAT2, LEU, dell'età del paziente e del sesso.

## ORIGINE DELLO STRESS OSSIDATIVO NELLE FAMIGLIE DEI DIABETICI INSULINO-DIPENDENTI

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

Laboratorio Analisi 1, Azienda Ospedaliera Pisana, \*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

### Scopo del lavoro

Obiettivo della ricerca è l'individuazione delle cause del disequilibrio redox riscontrato nelle famiglie dei diabetici tipo I insulino-dipendenti. Avendo già escluso difetti delle riserve antiossidanti cellulari e delle difese extracellulari, rimane da investigare la possibilità di un difetto a loro carico o, come probabile, di un'iperproduzione di radicali.

### Materiali e metodi

Il protocollo, articolato in una sola fase, vuole esaminare, nel corso di un anno circa, massimo 220 pazienti tra diabetici tipo I (40 soggetti), i loro familiari non diabetici (genitori, fratelli e sorelle, scelti con criteri di inclusione ed esclusione predefiniti) ed un gruppo di 60 soggetti sani con caratteristiche simili tali da essere confrontabili con diabetici e loro familiari. Si intendono valutare parametri ematochimici sierici ed urinari, compresi pannelli lipidici e vitaminici (B12, C, E), analisi citofluorimetrica, citochine e loro recettori, glutatione intraeritrocitaria, prodotti di ossidazione plasmatica e di quantificazione del danno ossidativo e perossidativo lipidico di membrana (fragilità osmotica eritrocitaria, livello di AOPP plasmatici, malonildialdeide), misurazione del controtrasporto Na-H eritrocitario, oltre ad un'attento studio cardiovascolare.

### Risultati

La valutazione delle difese antiossidanti di membrana, associata alla conferma della relazione tra funzionalità del controtrasporto Na-H nei diabetici e nei loro familiari non diabetici e gli indici di aumentata ossidazione cellulare e plasmatica, gli indicatori di attivazione delle popolazioni leucocitarie ed i livelli di citochine e loro recettori solubili possono vagliare l'ipotesi di difetti immunitari alla base dell'aumentata liberazione di radicali. La valutazione della funzione endoteliale ed emocoagulativa può individuare nell'endotelio una sorgente di radicali ma anche un possibile bersaglio dello stress ossidativo. L'ampiezza numerica della popolazione esaminata e l'approfondimento analitico strumentale previsto assicureranno il raggiungimento dell'obiettivo con un numero di dati inoppugnabile.

### Conclusioni

L'individuazione di nuovi fattori di rischio "familiari" potrebbe permettere di selezionare una batteria di esami semplici e di facile esecuzione in grado di individuare le famiglie che presentano una aggregazione di predittori di danno metabolico, cardiovascolare e renale ove programmare l'attuazione dell'opportuno intervento preventivo.

ELEVATED LEVELS OF DNA DAMAGE IS ASSOCIATED TO DIABETES IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Botto N., Masetti S., Manfredi S., Antonioli E., Colombo M.G., Vassalle C., Clerico A., Andreassi M.G.

CNR Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy

Somatic DNA damage has been suggested to contribute to the pathogenesis of chronic-degenerative illnesses such as atherosclerosis, diabetes mellitus and neurodegenerative diseases, although the molecular mechanism of this damage is not fully understood.

Aim of this work was to assess whether DNA is associated to the presence and severity of coronary artery disease as well as to some of the major atherogenic risk factors.

We studied 82 male patients submitted to coronary angiography. Significant CAD was considered present with  $\geq 50\%$  quantitatively assessed diameter stenosis in  $\geq 1$  coronary vessel. A semiquantitative angiographic Duke score (from 0 = normal to 100 = most severe disease) was used to evaluate the extent and severity of CAD. Each patient underwent micronucleus (MN) assay, which is a sensitive and reliable biomarker for evaluating spontaneous and mutagen-induced DNA damage. In addition comet assay was performed on a subset of 24 sex age-matched subjects (13 CAD patients and 11 no-CAD patients). Comet assay is fast approach for measuring of oxidative DNA damage by using lesion-specific enzymes, such as endonuclease III (Endo III) and formamidopyrimidine glycosylase (FPG), which creates strand breaks in the DNA at sites of oxidative damage.

A significant increase in MN frequency was observed in relation to smoking status ( $8.4 \pm 0.6$ ,  $11.9 \pm 1$  and  $12.0 \pm 1.6$ , for non smokers, ex-smokers and smokers, respectively;  $p=0.02$ ). Moreover, diabetic patients showed higher levels of MN than normal patients ( $13.5 \pm 1.4$  vs  $9.6 \pm 0.5$ ,  $p=0.002$ ). Also, MN frequency was significantly higher in CAD patients than in no-CAD patients ( $11.2 \pm 0.7$  vs  $8.0 \pm 0.9$ ,  $p=0.02$ ) and increased with the number of affected vessels ( $9.3 \pm 0.1$ ,  $12.2 \pm 1.5$  and  $12.5 \pm 1.3$  for one-, two-, and three-vessel disease, respectively;  $p=0.02$ ).

Mean values of DNA strand breaks, oxidized pyrimidines and altered purines were significantly higher in CAD patients respect to no-CAD patients ( $11.9 \pm 1.4$ ,  $18.0 \pm 2.7$  and  $18.1 \pm 3.1$  vs  $3.3 \pm 0.2$ ,  $2.7 \pm 0.5$  and  $4.5 \pm 1.1$ ;  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0009$ , respectively). Moreover, oxidized purines (e.g. 8-oxo-guanine) increased with the number of affected vessels and positively correlated with the extent of CAD measured by means of the number of the coronary lesions ( $r=0.76$ ,  $p=0.003$ ) and the Duke scoring system ( $r=0.66$ ,  $p=0.01$ ). Diabetic patients showed higher levels of oxidized pyrimidines ( $31.3 \pm 5.5$  vs  $14.1 \pm 2.7$ ;  $p=0.013$ ), while patients with dyslipidemia had elevated altered purines ( $20.4 \pm 2.6$  vs  $4.9 \pm 3.1$ ;  $p=0.03$ ) respect to normal patients.

These data indicate an overall increase of DNA damage in CAD patients correlated with the severity of the disease and some atherogenic risk factors supporting the concept that the DNA damage may be an important mechanism of microvascular complications of diabetes. In addition, the evaluation of somatic DNA damage could be an important pathogenic factor, an additional prognostic predictor, and a potential target of therapeutic strategies in coronary artery disease.

OXIDATIVE STATUS IN KIDNEY TRANSPLANTATION

Ippolito S.<sup>o</sup>, Bamonti F.<sup>o</sup>, Novembrino C.<sup>o</sup>, Campise M.\*,  
Lonati S.<sup>o</sup>, Ponticelli C.\*, Cornelli U.#

<sup>o</sup>Dpt. Scienze Mediche, Università-Ospedale Maggiore IRCCS via F. Sforza 35, 20122 Milano \*Unità Operativa di Nefrologia, Ospedale Maggiore IRCCS Milano via F. Sforza 35, 20122 Milano #Loyola University Medical Center Chicago

Hyperhomocysteinemia and oxidative status are one of the metabolic/reactive conditions which can influence the outcome of kidney transplantation. A cross sectional study was performed to evaluate both homocysteine (Hcy) metabolism and oxidative status on 113 kidney transplantation recipients (74 M/39 F, mean age  $40 \pm 12.2$  years), transplanted  $64.4 \pm 33$  months before, with stable plasma creatinine  $1.5 \pm 0.4$  mg/dl. Immunosuppression consisted of 3 different schedules: cyclosporine-based 74 patients (A), tacrolimus-based 24 (B), RAD or sirolimus-based associated with cyclosporine 15 (C). Plasma Hcy, serum vit B12 and folate (S-F), erythrocyte folate (ery-F) were measured by relevant immunoenzymatic assays (IMx, Abbott, USA); serum levels of reactive oxygen metabolites (ROMs), total antioxidant status (TAS), and reduced thiol groups (SH) were determined by relevant spectrophotometric methods (dROMs, OXY-Adsorbent, SH groups tests, Diacron, Italy). In 100/113 patients, there was hyperhomocysteinemia (cut-off  $< 10.2 \mu\text{mol/L}$ ) even if vitamins were in deficit in few patients (5/113 vit B12, 18/113 S-F, 15/113 ery-F). Seven different oxidative patterns, grouped into 3 main categories, were found: 1) hyporeactivity: H3 (reduced ROMs, TAS and SH) in 19% A patients, 12.5% B, 6.6% C; H2 (reduced ROMs and TAS but normal SH) in 6.7% A, 8.3% B, 13.3% C; H1 (reduced ROMs and -SH groups, but normal TAS) in 32.4% A, 16.6% B, 26.6% C; 2) balance (normal status) in 5.4% A, 12.5% B, 6.6% C; 3) stress S (increased ROMs, normal TAS and SH) in 4% A, 0% B, 6.6% C; S1 (increased ROMs, normal TAS and decreased SH) in 13.5% A, 33.3% B, 20% C, S2 (increased ROMs, reduced TAS and SH) in 18.9% A, 16.6% B, 20% C.

Our findings pointed out that hyperhomocysteinemia can cause graft transplantation and moreover, patients in group B in which the antioxidant reserve is not very depressed, showed a trend towards a more favourable pattern.

Biernacki M et al. Transplant Proc 2002; 34(2): 544-5

## OMOCISTEINA: UN CAMPIONE DELLA POPOLAZIONE

Rossi L., Lucchetti A., \*Palla P., \*\*De Marco S., \*\*Carrai M., °Paci A., ^Matteucci E., ^Giampietro O., Innocenti B.

^Dip. di Medicina Interna, Università di Pisa;

\*CentroTrasfusionale, °Med. Cardiovascolare,

Lab. Analisi I, \*\*Med.D'urgenza, Az. Osp. Pisana

Scopo della valutazione era di misurare i livelli di Hcy in due popolazioni con patologia cardiovascolare o metabolica e di confrontare i valori ottenuti con quelli dei gruppi di popolazione di controllo.

Materiali e metodi: Sono stati inclusi nello studio soggetti con malattia cardiovascolare (n. = 26, dei quali 24 con cardiopatia ischemica) o con diabete mellito di I tipo (n = 86). Sono stati inoltre arruolati, come gruppi di controllo, 86 donatori volontari di sangue e 57 pazienti ambulatoriali. I livelli plasmatici di Hcy sono stati misurati, su campioni prelevati lo stesso giorno e conservati in ghiaccio per il trasporto in laboratorio, con metodica FPIA sul sistema automatizzato Abbott IMx. Per ogni soggetto erano disponibili le seguenti caratteristiche demografiche: età, sesso e abitudine al fumo. E' stato eseguito un confronto dei livelli medi di Hcy e delle percentuali di soggetti con valori modicamente (>15 umol/L) o chiaramente elevati (>30 umol/L) tra i vari gruppi.

Gruppo	Cardiovascolari	Diabete
N. soggetti	26	86
Età media	64,6	41,9
Fumatori %	69,2	44,2
Rapporto M/F	2,25	0,75
Hcy fumatori (media e d.s.)	14,62±10,85	13,96±15,26
Hcy non fum.(media e d.s.)	14,18±4,28	10,96±8,91
Hcy maschi (media e d.s.)	15,15±10,34	14,77±15,41
Hcy femmine (media e d.s.)	12,98±4,89	10,41±8,65
Hcy totale (media e d.s.)	14,4±88,97	12,29±12,14
Hcy > 15 umol/L (n. e %)	6 (23,1)	11 (12,8)
Hcy > 30 umol/L (n. e %)	1 (3,8)	2 (2,3)
Gruppo	Donatori	Ambulatoriali
N. soggetti	86	57
Età media	36,6	45,3
Fumatori %	23,3	49,1
Rapporto M/F	2,44	1,04
Hcy fumatori (media e d.s.)	17,31±13,14	13,94±5,14
Hcy non fum.(media e d.s.)	13,17±8,27	11,46±4,58
Hcy maschi (media e d.s.)	15,23±10,3	14,31±4,95
Hcy femmine (media e d.s.)	11,43±7,57	11,15±4,54
Hcy totale (media e d.s.)	14,13±9,7	12,72±4,39
Hcy > 15 umol/L (n. e %)	17 (19,8)	12 (21,1)
Hcy > 30 umol/L (n. e %)	9 (10,5)	2 (3,5)

Discussione e conclusioni: Valori medi di Hcy costantemente superiori nei maschi rispetto alle femmine; non si sono rilevate differenze nei gruppi di pazienti rispetto ai gruppi di controllo; l'effetto del fumo sui livelli di Hcy era rilevabile solo nei due gruppi numericamente più consistenti (diabete e donatori di sangue). Proprio in questa categoria di soggetti "sani" era maggiormente frequente il riscontro di livelli chiaramente elevati di Hcy. Appare opportuno un controllo periodico dei livelli di Hcy nella popolazione "sana" o senza patologia apparente, dato il frequente riscontro di valori superiori alla norma.

## UN CASO EMBLEMATICO: GRAVE REAZIONE ANAFILATTICA DA TRASFUSIONE DI PLASMA IN SOGGETTO CON DEFICIT SELETTIVO DI IGA

Montani A.N., BrunoFranco M., Vimercati M.E., Vanelli S., Ongis G.A., Cassè C., Quadrelli G.C.

Dip. Patologia Clinica, °U.O. Medicina Interna, Presidio Osp. di Casalpusterlengo. (A.O. della Provincia di Lodi)

Viene ricoverata presso il reparto di Medicina Interna la Sig.ra G.M. per un forte dimagrimento con grave compromissione delle condizioni generali. Gli esami ematochimici di routine evidenziano una ipoproteinemia, una leggera anemizzazione e i test emocoagulativi evidenziano una tendenza emorragica. Per questi motivi veniva richiesto al servizio trasfusionale una unità di plasma fresco congelato omogruppo. Appena cominciata la trasfusione dell'emocomponente la paziente mostrava immediatamente cianosi marcatissima del viso e delle estremità, stenocardia intensa, assenza di pressione, di polsi periferici e dolori addominali. Tutta la sintomatologia e il quadro obiettivo permette di inquadrare l'evento clinico come un eclatante shock anafilattico. Susseguenti esami di laboratorio consigliati dal Servizio trasfusionale hanno evidenziato uno spiccato deficit selettivo di IgA, il dosaggio nefelometrico ne evidenzia un valore inferiore al limite di sensibilità dello strumento. Possiamo dunque inquadrare questo caso in una condizione abbastanza rara la cui prevalenza è di circa 1/180000, in cui in soggetti con deficit di IgA si possono riscontrare anticorpi anti IgA responsabili della reazione anafilattica stessa. Ci è poi sembrato utile eseguire ulteriori accertamenti ematochimici, in quanto sia la condizione clinica che il quadro laboratoristico sembravano far propendere per una forma di celiachia ad insorgenza tardiva. Sono stati ricercati gli anticorpi anti endomisio e gli anticorpi anti gliadina sia di classe IgG che di Classe IgA. Entrambi gli esami sono risultati negativi, però la conferma diagnostica derivante dall'esame bioptico intestinale con e senza dieta priva di glutine non è invero stata eseguita. Sarebbe interessante anche la ricerca di anticorpi anti transglutaminasi, da alcuni considerati più sensibili rispetto agli altri indicatori biochimici, nella diagnosi della celiachia.

Alla paziente è stato perfettamente spiegato il suo problema ed in particolare di portare sempre con sé un cartellino con chiare indicazioni della sua forma allergica, in particolare evidenziando il fatto che in caso di assoluta necessità di trasfusione di emazie concentrate, queste vadano obbligatoriamente lavate e filtrate prima della somministrazione per eliminare quanto più possibile ogni residuo di proteine plasmatiche ed eventualmente effettuare una premedicazione a base di un composto cortisonico.