

CATHECOL-O-METIL-TRANSFERASI (COMT) INHIBITORS IN THE TREATMENT OF TETRAHYDROBIOPTERIN DEFICIENCY

Martini A.\*, Leone L.\*, Ponzzone A. #, Baglieri S.#, Battistoni G.#

\*Clinical Biochemistry Laboratory, Department of Clinical Pathology; #Department of Pediatrics, University of Torino; Children Hospital "Regina Margherita", Torino (Italy)

Background: Pediatric patients affected by inherited BH4 deficiency, due to DHPR or PTPS enzymatic defect, are usually treated with a "multiple therapy" (diet plus administration of neurotransmitter precursors plus BH4), according to the severity of the disease. A limiting factor in this therapeutic approach is the short half-life of 3,4-dihydroxy phenylalanine (L-dopa). These needs repeated and increasing doses of administered precursors. Some benefit can be obtained either by definitely lowering the level of plasma phenylalanine or by inhibiting the catabolism of neurotransmitters with the use of MAO inhibitors (1).

Objective: Aim of this work is the attempt to administrate Entacapone, a reversible inhibitor of COMT activity (2), in order to reduce the daily dosage and the number of the administrations of neurotransmitter precursors, without changes of motor fluctuation.

Methods: Six patients (age 3-18 years) affected by DHPR or PTPS defect were treated with "multiple therapy" alone and then with Entacapone at the dose of 15 mg/kg/die. The evaluation of the efficacy was based on the assessment of neuromotor performances and included the evaluation of dopamine and prolactin blood fluctuations and a kinetics analysis of L-dopa and 3-O-metil-dopa (3-OMD) plasma levels, before and after Entacapone addiction. The determination of dopamine, L-dopa and 3-OMD was performed by a reversed-phase HPLC methods previously published (3) with slight modifications; prolactin concentration was assayed by an immunometric method. Results: For all patients was observed a substantial increase of  $AUC_{(0-12h)}$  and  $C_{max}$  for L-dopa and a significant reduction of  $AUC_{(0-12h)}$  and  $C_{max}$  for 3-OMD. No changes was observed for  $t_{1/2B}$  and  $t_{max}$  for both substances ( $t_{1/2B}$  for L-dopa was  $1,19 \pm 0,21$  h.  $t_{1/2B}$  for 3-OMD was  $21,2 \pm 3,6$  h.). On the other hand, motor fluctuations was partially reduced (four patients) or unaffected (two patients).

Conclusions: The preliminary kinetics data are in agreement with previous reported literature and show that COMT inhibitors may improve substitutive neurotransmitter therapy, also allowing a 30% reduction of the daily dosage and number of administrations of L-dopa.

REFERENCES

- 1) Schuler A., Ponzzone A., Eur. J. Ped., 154, 997, 1995.
- 2) Bonifati V. et al., Pharmacol. Ther., 81, 1-36, 1999.
- 3) Baruzzi A. et al., J. Chrom., 346, 165-169, 1986.

SERUM MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN NON RESPONDER CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS TREATED WITH INTERFERON AND RIBAVIRIN

Sonnante A.M., Cozzolongo R<sup>1</sup>, Guerra V.<sup>2</sup>, Cuppone R.<sup>1</sup>, Manghisi O.G.<sup>1</sup>, Correale M.

Clinical Pathology Laboratory, Division of Gastroenterology<sup>1</sup>, Laboratory of Epidemiology<sup>2</sup>, Institute of Gastroenterology, IRCCS Castellana Grotte, (BA) Italy

Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) are important in determining deposition and breakdown of the extracellular matrix. As chronic liver disease progresses a tissue remodelling occurs, which involves increased matrix turnover and produces the development of liver cirrhosis. We measured circulating levels of MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 in 59 patients with chronic hepatitis C non responder to a previous course of interferon treatment and retreated with interferon (IFN) and ribavirin (RBV), to evaluate if MMPs and TIMPs are related to liver fibrosis and can be considered as predictive markers of response to IFN and RIB therapy. MMPs and TIMPs were also measured in 22 healthy subjects used as control group.

MMPs and TIMPs levels were measured by ELISA (Biotrak Amersham). HCV RNA was detected by PCR (Amplicor HCV, Roche Diagnostic).

We found significantly different TIMP-1 ( $p=0.0001$ ), TIMP-2 ( $p=0.0001$ ) and MMP-1 ( $p=0.0001$ ) levels in patients respect to the controls, whereas MMP-2 levels were not different between the two groups. There was a significant relationship between TIMP-1 ( $r=0.34$ ,  $p=0.008$ ), TIMP-2 ( $r=0.2$ ,  $p=0.03$ ) and liver fibrosis; MMP-1 levels ( $r=-0.27$ ,  $p=0.03$ ) were inversely related to liver fibrosis. Concerning the response to IFN and RIB therapy, we could not find any significant difference in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-1 levels between the group of responder and non responder patients, even if TIMP-1 levels tended to be reduced in responders. In conclusion serum levels of TIMP-1, TIMP-2, MMP-1 might be useful for estimating the degree of liver fibrosis; they seem not to be the ideal markers of predictive response to IFN and RIB therapy, but further studies involving a larger number of patients are necessary to clarify this role.

Mitsuda A., Suou T., Ikuta Y., Kawasaki H., Changes in serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 after interferon treatment in chronic hepatitis C. J Hepatol 2000;32:666-72.

## INCREASED ACTIVITY OF MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Clemente C., \*Elba S., \*Buongiorno G., Di Leo A.

Laboratory of Experimental Biochemistry, \*Division of Medicine-IRCCS S. De Bellis" Castellana Grotte (BA)

One of the most enzymes involved in the primary cellular defence against free radicals is superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation of the superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide. In human tissues, SOD is present in three forms, a constitutive cytoplasmic copper/zinc SOD (Cu/ZnSOD), an inducible mitochondrial manganese SOD (MnSOD), and an extracellular SOD. Many reports have shown that various human tumors contain elevated MnSOD antigen levels, assessed either immunohistochemically or by ELISA in serum samples or tissue homogenates. Besides, enhanced expression of MnSOD is present in tumor tissues of patients with cancer of esophagus, stomach, lung, colon and ovary. Little is known as regards the significance of MnSOD in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). Chronic liver diseases often begin with chronic hepatitis and can evolve to cirrhosis and then HCC. There are few studies that have found elevated serum MnSOD levels in patients with HCC, and relatively high values were also observed in patients with liver cirrhosis (1). The aim of our study was to evaluate whether changes in the activity of the antioxidant enzyme MnSOD were present both in patients with liver cirrhosis and in cirrhotic patients with HCC. Methodology. Serum activity of MnSOD was assessed in patients with Child-Pugh class A liver cirrhosis with (n=10) and without (n=28) HCC. These results were compared with those of healthy subjects (n=21). Mn SOD activity was assayed spectrophotometrically by xanthine/xanthine oxidase/nitrobluetetrazolium (NTB) method in presence of sodium cyanide which inhibits Cu/ZnSOD activity. The enzyme activity is expressed in U/ml, where one unit is the amount required to inhibit the rate of NTB reduction of 50%. All data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE). The statistical analysis was assessed by the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls test. Results. The differences among the three groups are statistically significant,  $p=0.006$ ; the post test shows that there are significant differences between the healthy patients ( $0.20 \text{ U/ml} \pm 0.025$ ) and patients with liver cirrhosis ( $0.38 \text{ U/ml} \pm 0.046$ ,  $p<0.01$ ) and between the healthy patients and the cirrhotic patients with HCC ( $0.46 \text{ U/ml} \pm 0.10$ ,  $p<0.05$ ). There are no differences between cirrhotic patients and HCC patients, even if the SOD activity is higher in these last patients. Conclusion. The data show that MnSOD activity is increased in cirrhotic patients and that this increase is higher in cirrhotic patients with HCC. Our findings indicate that the sequence of successive pathological stages in human liver carcinogenesis can be accompanied by an increase in MnSOD activity.

(1) Clin Chem (2001) 47:1696-1700

## RELAZIONE TRA PROTEINA C REATTIVA E TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

Fortuna A., Anderlini R., Melegari A., Tagliazucchi M., Modena\* M.G., Bursi\* F., Carbonieri A.

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, \*Istituto di Cardiologia. Azienda Ospedaliera-Universitaria, Policlinico di Modena

La proteina C reattiva (PCR) sintetizzata nel fegato è una proteina riscontrabile soprattutto nella fase acuta di processi infiammatori. Recentemente la determinazione della proteina C reattiva è stata impiegata e discussa per la valutazione del rischio di cardiopatia coronarica.

È stato dimostrato che nella popolazione femminile alti livelli di PCR valutati con test altamente sensibili, giocano un ruolo importante nella stadiazione del rischio cardiovascolare. Diversi approcci terapeutici di somministrazione ormonale hanno mostrato una influenza significativa sull'aumento della PCR come indicatore predittivo di eventi cardiovascolari (1). Questo studio compara i livelli della PCR di un gruppo di donne sane in postmenopausa sottoposte a terapia ormonale sostitutiva (orale o transdermica) scelte da un gruppo selezionato per lo studio e la prevenzione di malattie correlate alla menopausa, sulla base di informazioni cliniche ed anamnestiche ben definite. Tale popolazione è stata suddivisa in 3 gruppi in base alla via di somministrazione di estrogeni: 1° gruppo via orale, 2° gruppo via transdermica, 3° gruppo nessuna terapia ormonale. Per la determinazione quantitativa dei livelli di PCR ad alta sensibilità, è stato utilizzato il kit CRP (Latex) US della Ditta Roche Diagnostics S.p.A. e l'analizzatore MODULAR P della stessa Ditta. I campioni di sangue delle pazienti arruolate nello studio sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10' e congelati a  $-40^{\circ}\text{C}$  fino all'esecuzione del test. Tutti i campioni sono stati processati simultaneamente per evitare possibili variabili operative. Comparando i tre gruppi in esame l'analisi statistica ha mostrato come vi sia una sostanziale differenza nei livelli medi di PCR in relazione alla via di somministrazione ormonale adottata. Poiché queste osservazioni possono avere una importante rilevanza clinica si auspicano ulteriori indagini al fine di definire i meccanismi attraverso i quali gli estrogeni esercitano stimoli diretti e/o indiretti sulle cellule epatiche e sui livelli della proteina C reattiva.

(1) Ridker PM, et al. Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-protein. Circulation 1999; 100:713-716

STRESS OSSIDATIVO ED EMODIALISI: LA RIMOZIONE PIU' EFFICACE DI MEDIE MOLECOLE RIDUCE I LIVELLI PLASMATICI DEI RADICALI LIBERI ?

Dambrosio A., Magnanti M., Amati L., Stella E., Galliani M.\*, Palumbo R.\*, Paone A.\*, Fumagalli E., Bondanini F., Vasselli C.

U.O. Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche, \*U.O. Nefrologia Dialisi e Litotrissia, Ospedale "S. Pertini", ASLRMB, Roma.

Nell'ultimo decennio numerosi studi hanno dimostrato un aumento dei livelli di stress ossidativo (SO) nei soggetti con insufficienza renale cronica, specialmente se in fase terminale. In particolare, nei soggetti in emodialisi cronica (HD), i livelli di SO dipendono da due meccanismi che hanno luogo durante la seduta emodialitica: 1) la produzione di radicali liberi (RL) indotta dal contatto sangue/membrana del filtro di dialisi; 2) l'allontanamento di RL nel dialisato. L'utilizzo di membrane biocompatibili e di tecniche dialitiche più efficaci comporterebbe, nei soggetti emodializzati, un minor danno da SO. Inoltre, uno studio di Roselaar e coll. ha dimostrato che le sostanze ad azione ossidante, presenti nel plasma del soggetto uremico, sarebbero caratterizzate da un peso molecolare di circa 5000 D. Scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare se le metodiche dialitiche convettive hanno una maggiore efficacia, rispetto a quelle tradizionali, nel rimuovere sostanze di medio peso molecolare e quindi tossine ad azione ossidante. Abbiamo sottoposto 10 soggetti (4M, 6F, età media 62±15 aa) in HD con frequenza trisettimanale a 3 cicli di trattamento, di 6 settimane ciascuno, con 3 metodiche dialitiche diverse, con crescente efficacia nel rimuovere sostanze a medio peso molecolare: 1) emodialisi standard (HDs); 2) emodiafiltrazione on-line (HDF); 3) emofiltrazione on-line (HF). Al termine di ogni ciclo di trattamento, dalla fistola arterovenosa, prima e dopo la seduta emodialitica, a ciascun paziente venivano prelevati con sistema Vacutainer (Becton Dickinson) 20 cc di sangue in provette con eparina sodica. Il sangue veniva centrifugato a 4000 rpm per 15 min. a 4°C e il plasma così ottenuto veniva aliquotato e stoccato a -70°C fino al momento delle determinazioni analitiche. In un'unica seduta analitica, su tutti i campioni venivano determinati i livelli di: 1)  $\beta_2$ -microglobulina, quale sostanza dializzabile avente peso molecolare circa uguale alle tossine uremiche ad azione ossidante (analizzatore automatico per immunodosaggi in chemiluminescenza Immulite); 2) derivati dei metaboliti reattivi dell'O<sub>2</sub> (d-ROMs Test, Diacron, Grosseto, spettrofotometro Beckman DU-65). L'analisi statistica è stata condotta mediante Analisi della Varianza per Misure Ripetute sulle variabili misurate al tempo zero per ciascuna tecnica dialitica; sono state quindi calcolate le variazioni percentuali della  $\beta_2$ -microglobulina e dei d-ROMs tra prima e dopo il trattamento dialitico e tali variazioni sono state studiate mediante una Analisi della Varianza per Misure Ripetute con 1 fattore within: therapy (tre livelli). I risultati del nostro studio indicano che i livelli della  $\beta_2$ -microglobulina, mentre non variano in seguito a trattamento con HDs, diminuiscono notevolmente con HDF e HF (p<0,0001). I livelli di SO, come indicato dalla misurazione dei livelli plasmatici dei d-ROMs, non si discostano significativamente, al termine del trattamento emodialitico, dai livelli basali, in seguito a trattamento con HDs e HDF. Al contrario, in seguito a trattamento con HF, i livelli plasmatici dei d-ROMs diminuiscono in modo significativo (p<0,01). In conclusione, HF sembra rimuovere efficacemente sostanze a medio peso molecolare e quindi RL. Questi risultati meriterebbero di essere confermati su un più alto numero di soggetti, alla luce dell'importanza del ruolo che i RL giocano nella fisiopatologia delle complicanze dell'uremia.

COMPARISON OF UREA BREATH TEST (UBT) AND THREE STOOL ANTIGEN TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF HELICOBACTER PYLORI (Hp) AFTER ERADICATION THERAPY

Bilardi C, Biagini R, Dulbecco P, Iiritano E, Gambaro C, Mele MR, Borro P, Tessieri L, Zentilin P and Savarino V. Di.M.I. Università di Genova, Genoa, Italy

*Introduction.* Several non invasive techniques have been developed in these years to diagnose infection with Hp. The purpose of our study was to assess the reliability of UBT and three tests for the search of Hp stool antigens in the assessment of the efficacy of anti-Hp therapy.

*Methods.* 100 consecutive patients (M/F = 36/64, mean age = 55.7 ± 12.7) have been enrolled in our study. All patients were Hp positive, on the basis of the concomitant results of Clo test and histology, and underwent one week treatment with various triple therapies. They were again endoscoped at least 4 weeks after treatment and two biopsy specimens in gastric antrum and two in corpus were taken for histological examination and rapid urease test. UBT was also performed (cut-off value = 5‰). The three stool antigen tests were the following: HpSA (Meridian Diagnostic Europe, Milan, Italy; cut-off = OD > 0.160), Rapid test (Medimar, Milan, Italy; qualitative evaluation) and Helicobacter pylori H.S. (Medic, Pavone C.se, Turin, Italy; cut-off = OD > 0.250). Fischer's test was used for statistical analysis.

*Results.* On the basis of endoscopy-based tests, 77/100 patients resulted Hp negative and 23/100 Hp positive after treatment. The sensitivity and specificity of the four tests are reported in the table:

Method	Sensitivity	Specificity
UBT	21/23 (91%) 95%CI 83-99	76/77 (98%) 95%CI 96-100
HpSA	20/23 (87%) 95%CI 65-88	68/77 (88%) 95%CI 72-90
Rapid Test	19/23 (83%) 95%CI 61-85	66/77 (86%) 95%CI 70-87
HpHS	20/23 (87%) 95%CI 65-88	65/77 (84%) 95%CI 70-85

The reliability of the three Hp stool antigen tests was similar (p = 0.35) in assessing the efficacy of anti-Hp therapy. Their sensitivity did not differ from that of UBT, but their specificity was significantly lower than that of UBT (p < 0.001).

*Conclusion.* The three Hp stool antigen tests are equivalent in the non-invasive diagnosis of the outcome of anti-Hp therapy. Their number of false-positive results, however, was significantly higher than that of UBT.

LA CISTATINA C E LA TIPIZZAZIONE DELLA PROTEINURIA: UTILI STRUMENTI PER IL FOLLOW UP DEI PAZIENTI CON MONORENE

Gai M., Piccoli G.B., Malfi B., Jeantet A., Anania P., Mezza E., Motta D., Cesana P., Cacace G., Picciotto G., Segoloni G.P., Lanfranco G.

Cattedra di Nefrologia – Università di Torino

\*U.O.A. Fisica Sanitaria

\*\*U.O.A. Medicina Nucleare

Lo studio e le implicazioni della perdita di massa nefronica rimangono uno degli argomenti più interessanti e stimolanti della fisiopatologia renale. Da questo punto di vista i pazienti con monorene congenito o chirurgico si presentano come una popolazione ottimale per condurre indagini sui meccanismi emodinamici di compenso alla riduzione della massa renale, sulla iperfiltrazione dei nefroni residui e sulla possibilità di maggior sviluppo di proteinuria. D'altra parte poco si sa sulla predisposizione di tali pazienti alla riduzione di funzionalità renale o di progressione di un danno precedentemente instaurato. Abbiamo selezionato 20 pazienti con monorene chirurgico (6 per carcinoma, 7 per idronefrosi ostruttiva, 3 per PNC, 1 per TBC, 1 per sanguinamento post-biopsia) e 2 con monorene congenito. Il range di funzionalità renale è molto ampio (creatininemia 0.7-6.4 mg/dl). L'età media è di 59 anni (range 24-80). Tali pazienti sono stati avviati ad un ambulatorio dedicato che prevede all'ingresso uno screening completo della funzionalità renale (creatininemia, cistatina C sierica, clearances renali, elettroliti, esame urine, proteinuria 24h e GFR radioisotopico) e la tipizzazione qualitativa (immunofissazione e SDS-AGE) e quantitativa (nefelometria) della proteinuria su urine spot del mattino. I dati preliminari di tale studio, oltre a confermare che, al momento, il miglior indice indiretto di valutazione della funzionalità renale è dato dalla formula di Cockcroft (correlazione Cockcroft vs GFR  $R=0.92$ ), sembrano indicare nella cistatina C un indice di ridotta funzione renale più sensibile della creatinina (cistatina vs GFR  $R=0.73$ ; creatinina vs GFR  $R=0.64$ ) e permettono di suddividere la popolazione in 6 classi rispetto al tipo di proteinuria: fisiologica (5 casi), glomerulare selettiva (5), glomerulare non selettiva (1), tubulare incompleta (1), glomerulare selettiva e tubulare incompleta (6), glomerulare non selettiva e tubulare completa (2). Inoltre il pattern della proteinuria sembra correlare con il quadro funzionale renale: il danno tubulo-interstiziale che si manifesta con la presenza di una proteinuria tubulare completa o incompleta si associa con valori di GFR più bassi e sembrerebbe quindi predire una più veloce progressione del danno renale. Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. *Am J Kidney Dis*; 2001, 37 (1): 79-83.

CORRELATION BETWEEN CEREBRAL BLOOD FLOW AND GLUCOSE METABOLISM IS MAINTAINED IN ALZHEIMER'S DISEASE

Ricciardi E., Furey M.L., Metelli M.R., Panicucci E., Pietrini P.

Scuola Superiore S. Anna, Pisa; NIMH, NIH, Bethesda MD, USA; Sezione di Biochimica Clinica e Dip. Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Università di Pisa

In physiological conditions, the human brain utilizes glucose as the exclusive source of energy and relies on cerebral blood flow for a constant supply of both glucose and oxygen. Energy in the brain is mostly used for neuronal synaptic activity and thus it has been assumed that measures of energy consumption represent a reliable index of neuronal function. As in young and older healthy humans regional cerebral blood flow (rCBF) is strongly correlated to regional cerebral metabolic rate of glucose (rCMRglc - a reliable index of neuronal/synaptic activity) at rest and during audiovisual stimulation (AS), methodologies that rely on measures of blood flow related phenomena, like  $^{15}\text{O}$ -water PET or fMRI, are widely used to assess neurometabolic correlates of human brain function in distinct physiological conditions. Alzheimer's disease (AD) is characterized by complex neuropathological processes affecting neurons and cerebral vessels, which could disrupt specifically the physiological mechanisms that couple rCBF to rCMRglc. To determine whether the physiological coupling between rCBF and rCMRglc is maintained in AD under different conditions of brain activity, absolute and normalized (to sensorimotor cortex, a brain region relatively preserved in AD) rCBF and rCMRglc were measured in 43 cortical and subcortical areas in 9 otherwise healthy normotensive patients with AD (mean age  $\pm$  s.d. =  $69 \pm 8$  yr; NINDS-ADRDA criteria; Mattis DRS = 91, range 23-128) at rest (eyes covered/ ears plugged) and during AS (watching and listening to a colorful movie) using  $^{15}\text{O}$ -water and  $^{18}\text{F}$ FDG PET, respectively. Global CMRglc and CBF values were significantly ( $p < 0.05$ ) higher during AS compared to rest. Mean rCBF and rCMRglc values correlated across regions at rest and during AS ( $p < 0.0001$ ), for both absolute ( $r^2 = 0.72$ ) and normalized ( $r^2 = 0.74$ ) values. A comparison between regression plots at rest and during AS showed no difference between linear slopes or correlation coefficients for either absolute ( $Z = -1.18$  and  $Z = 0.53$ , respectively) or normalized ( $Z = -0.09$  and  $Z = 0.65$ ) data. A difference was observed for intercepts ( $Z = 4.11$ ), likely reflecting changes due to brain stimulation. No discrepancies were assessed with normalized values ( $Z = -0.09$ ,  $Z = 0.65$ ,  $Z = 0.09$ ). These results indicate that the physiological coupling between rCMRglc and rCBF is preserved in AD both at rest and during AS. Thus, changes in blood flow related measures represent a reliable neurometabolic index of altered synaptic activity in the brain of patients with AD, and are not due to an aspecific disruption of the microcirculation associated with the neuropathological process.

CRISTALLURIA ASSOCIATA A FARMACI INIBITORI DELLA POMPA PROTONICA

Bonfant<sup>1</sup> G., Belfanti<sup>1</sup> P., Gabrielli<sup>1</sup> D., Molino A<sup>1</sup>., Crotta<sup>2</sup> S., Gibellino<sup>3</sup> C., Alloatti<sup>1</sup> S.

<sup>1</sup>U.B. Nefrologia e Dialisi, <sup>2</sup>U.B. Gastroenterologia dell'Ospedale di Aosta, <sup>3</sup>ARPA Valle d'Aosta, Aosta.

Gli inibitori della pompa protonica (IPP) sono una famiglia di farmaci, contenenti un nucleo benzimidazolico, largamente impiegati per il trattamento di patologie legate all'ipersecrezione gastrica. La maggior parte della dose somministrata (circa 70%) è eliminata nelle urine sotto forma di metaboliti.

Nelle urine di un paziente portatore di trapianto renale, abbiamo riscontrato alcuni cristalli sconosciuti, che abbiamo in seguito ipotizzato essere di omeprazolo o un suo metabolita, poiché è stato fatto un riscontro analogo nelle urine di un altro soggetto che aveva in comune con il primo soltanto l'assunzione di questo farmaco. I cristalli, evidenziati all'esame del sedimento, consistono in sottili fibre brune, isolate o raccolte in strutture a covone o a fiocco, intra o extracellulari. La lunghezza di un singolo elemento è di circa 10-20 micrometri. In campo scuro, appaiono di colore verde brillante.

Benché in letteratura esistano segnalazioni di nefropatie interstiziali, infezioni delle vie urinarie, piuria e albuminuria associate all'omeprazolo, la presenza di cristalluria caratteristica non è mai stata citata.

Al fine di approfondire i precedenti riscontri, abbiamo effettuato un esame chimico e microscopico delle urine di pazienti che assumevano omeprazolo, pantoprazolo, lansoprazolo o rabeprazolo (IPP+, n=78), e di un gruppo di controllo (IPP-, n=77), verificando la presenza dei cristalli sopra descritti (C+/C-) e di anomalie urinarie (AU+/AU-), quali albuminuria, ematuria, leucocituria. Per la ricerca dei cristalli, sono stati completamente esaminati 10 microlitri di sedimento urinario in microscopia a contrasto di fase e in campo scuro. I risultati sono riportati nella tabella seguente:

	AU+		AU-		C-
	IPP+	IPP-	IPP+	IPP-	
C+	19	1	6	0	
	25	45	28	31	

In 4 pazienti C+ la presenza del farmaco era sospetta e non documentata. L'unico caso C+/IPP- assumeva ranitidina. Il pH urinario era < 6,0 nel 92% dei campioni positivi.

In conclusione, esiste una possibile associazione tra l'assunzione di IPP e la presenza di cristalli caratteristici nelle urine acide. Tale cristalluria appare più frequentemente associata ad anomalie urinarie, ma sono necessari ulteriori studi per chiarire il significato clinico di tale reperto.

EFFECTS OF PROSTACYCLINE ANALOG (ILOPROST) ON ICAM-1 AND F1+2 LEVELS IN CRITICAL ISCHEMIA IN HUMANS

Stefanin C.\*, Mazzone A.°, Faggioli P.°, Cusa C.°, Rondena M.°, Grassi C.°, Lazzati L.\*, Morelli B.\*

U.O. Laboratory of Hematology\*, Internal Medicine and Oncology°, Ospedale Civile di Legnano, Via Candiani 2, 20025 Legnano

*Background.*

Iloprost has beneficial effects on microcirculation preventing the reciprocal potentiation of platelet and leukocyte activation, leading to vascular endothelial damage and to acute thrombosis. The mechanisms of actions are not completely known yet.

*Aim of this study* was to evaluate the effects of one course of treatment on the adhesion molecule ICAM-1 and on the marker of coagulation cascade F1+2, in patients suffering from systemic sclerosis (SS) and peripheral artery occlusive disease (PAOD).

*Patients and Methods.*

40 patients (pts) were enrolled in the study: 29 with SS; 11 with PAOD. Iloprost was administered for 5 days in SS and for 21 days in AOC. The plasma concentrations of ICAM-1 and F1+2 were detected on the first day and at the end of the first course therapy.

*Results.* In all of the pts a significant reduction in the plasma levels of ICAM-1 and F1+2 was observed. In SS pts the ICAM-1 (mean±ES ng/mL) level was 850,27±58,9 at baseline and 757,96±48,2 after 21 days ( $p<0,005$ ); the F1+2 (mean±ES nMoli/l) level was 0,985±0,05 vs 0,875±0,04 ( $p<0,0005$ ). In PAOD pts the ICAM-1 level was 758,27±28,50 at baseline and 667,27±29,17 after 5 days ( $p<0,05$ ); the F1+2 level was 0,818±0,10 vs 0,681±0,09 ( $p<0,005$ ).

*Conclusions.* The study suggests that iloprost has a clinically beneficial effect on the complexes actions on platelets, leukocytes, endothelial and coagulation cascade. *Reference.* Della Bella S. et al. Novel mode of action of iloprost: in vitro downregulation of endothelial cell adhesion molecules. Prostaglandins 2001 Jun; 65 (2-3): 73-83

## IN VIVO TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY: COMPARISON OF DIFFERENT ANALYTICAL METHODS

Vassalle C., Lubrano V., Carpeggiani C., L'Abbate A., Zucchelli GC.

CNR-Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa.

**Introduction:** Living organisms have developed a complex antioxidant network to counteract reactive species that are detrimental to human life. Thus, it is of extremely importance to measure these factors in assessing in vivo antioxidant status in different physio-pathological situations. However, the number of different antioxidants in serum or other biological samples makes it difficult to measure each element separately. In addition, the possible interaction among different antioxidants in vivo also makes the measurement of any individual antioxidant not representative of the overall anti-oxidant status. Therefore, several methods have been developed to assess the total antioxidant capacity (TAC). However, because the measured TAC of a biological sample depends on which oxidant is used in the measurement, the comparison of different analytical methods represents a crucial factor in helping investigators to choose and to understand the results obtained using a specific method. **Aim and methods:** To evaluate analytical characteristics of two different assays: ferric reducing ability (FRAP) assay (1) and a kit based on the serum sample capacity to inactivate the oxidant solution (HClO) added in excess in the sample (PAT, Diacron, Italy). The second aim of our study is to verify the laboratory reliability of these methods, and their possible relationship with plasma determination of oxygen free radicals (dROMS test, Diacron, Italy). Unselected out-patients referred to the Institute of Clinical Physiology were studied (n=187, 58 females, 129 males, mean age: 65±11 years). All blood samples were maintained on ice, centrifuged within 15 minutes after blood collection and then stored at -80°C until performance of assay procedures.

**Results:** The lower limit of sensitivity for PAT assay was 11.7 µmol/L, and linearity was observed from 100 to 400 µmol HClO/ml of TAC levels (r=0.99, p<0.001). PAT mean value in plasma samples accounted for 366.2±7.2 µmol/L HClO/ml. Mean PAT in females (353.4±13.2 µmol/L HClO/ml) were not different from those detected in males (372±8.6 µmol/L HClO/ml). The lower limit of sensitivity for FRAP assay was 11 µmol/L, and linearity was observed from 1 to 1000 µmol/L of TAC levels (r=0.99, p<0.001). FRAP mean value in plasma samples, evaluated in 102 patients, accounted for 514.1±19.1 µmol/L. Mean FRAP in females (469±22.5 µmol/L) were not different from those detected in males (535±25.6 µmol/L). A significant direct relationship was observed when comparing FRAP with PAT (p<0.05; r=0.22) in the whole population. A high significant inverse correlation between oxidative stress and both PAT (p<0.05; r=0.17) and FRAP (p<0.01; r=0.27) levels was observed.

**Conclusion:** The evaluation of PAT and/or FRAP levels in human blood samples represents a sensible and practicable indicator of total antioxidant capacity. Both methods are quick and simple and can be used to process a large number of samples. For this reason, these methods may be considered suitable for routine application in clinical chemistry laboratories and/or physiopathological studies concerning human blood samples. However, it should be paid particular care to the protocol of collection and storage of samples.

1. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70-6.

## IN VIVO METABOLIC STUDIES OF THE EFFECTS OF THE PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN HUMANS

Furey M.L., Ricciardi E., Panicucci E., Pietrini P.

Scuola Superiore S. Anna, Pisa; Sezione di Biochimica Clinica e Dip. Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Università di Pisa; NIMH, NIH, Bethesda USA

The in vivo pharmacological inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, such as with physostigmine (PHY), enhances cholinergic system transmission and improves memory performance. These effects are associated with metabolic changes underlying neuronal activity in brain regions crucial for memory. In humans, visual cortical areas and right prefrontal cortex (PFC) are activated during visual working memory (WM) tasks and the cholinergic enhancement results in improved task performance and a correlated reduction of the magnitude of metabolic activity in right PFC region during task, likely due to improved stimulus processing in other brain regions. The aging process is associated with a decrease in memory functions and in the activity of the cholinergic system. Given that brain activity during memory tasks changes with healthy aging, we determined how the cholinergic potentiation differentially influenced the brain metabolic response to a visual WM task in young and older healthy subjects.

Using PET, we measured regional cerebral blood flow (rCBF) in 14 young (27±6 yr) and 16 older (64±11 yr) healthy subjects across 10 scans that alternated between WM for faces and rest. In all subjects, the first 2 scans were obtained during i.v. saline infusion. Eight young and 11 older subjects then received i.v. PHY (1 mg/hr); the remaining 6 young and 5 older subjects continued to receive saline. PHY significantly reduced reaction time in both age groups (p<0.05) and task rCBF in superior and inferior frontal regions (p<0.01) in the young and in anterior and posterior middle frontal regions in the older subjects. When the 2 groups were compared directly, the rCBF reduction in right superior and inferior frontal cortex observed in the young was absent in the older subjects. Further, there was a significantly larger reduction in rCBF in anterior cingulate and right hippocampus in the older group. Young and older subjects recruited different right PFC regions when performing the WM task for faces, while maintaining high levels of accuracy performance. Enhancement of cholinergic activity improved performance on the WM task to the same extent in both age groups. However, the distribution of the PFC regions modulated by physostigmine differed between young and older subjects. In each group the cholinergic enhancement affected the PFC region that was activated prior to the drug. The drug-associated reduction in the activation of additional PFC areas involved in WM in the elderly subjects is consistent with the hypothesis that additional PFC areas are recruited to compensate for age-associated changes in regional functional contributions to WM in that, if other network regions process information more efficiently, the need for right PFC involvement is reduced.

## DOSAGGIO IRMA DELLA MOLECOLA INTERA (1-84) DEL PTH-CAP IN PAZIENTI UREMICI DIALIZZATI

Ricciotti R., Torelli F., Giunta S., Baldini S.\*, Panichi N.\*

U.O. Laboratorio Analisi, INRCA, Ancona – Direttore Dr. S. Giunta; \*U.O. Nefrologia, INRCA, Ancona – Direttore Dr. N. Panichi

La determinazione serica della molecola intera (1-84) biologicamente attiva dell'ormone paratiroideo (PTH) è spesso influenzata dall'interferenza del frammento 7-84 il quale si origina per distacco di un esapeptide a livello dell'estremità NH<sub>2</sub>-terminale. Tale frammento è chiamato big PTH o CIP (Cyclase Inactive-PTH). E' quindi importante una corretta stima della concentrazione della molecola intera del PTH (1-84), chiamata CAP (Cyclase Activating – PTH). Ciò è di particolare rilievo per ottimizzare il trattamento farmacologico dell'iperparatiroidismo secondario dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) per i quali il livello di PTH dovrebbe essere 3-5 volte quello normale e il rapporto CAP/CIP compreso tra 1 e 1.5 nel tentativo di ridurre l'incidenza dell'osteodistrofia renale. *Scopo:* correlare il PTH-CAP ed il PTH totale con il PTH intatto (iPTH) precedentemente dosato con altra metodica IRMA. Calcolare il rapporto CAP/CIP ad intervalli di tempo in pazienti sottoposti a dialisi.

*Materiali e metodi:* a 60 pazienti affetti da IRC sono stati determinati, nel sangue venoso prelevato a digiuno, il PTH totale ed il PTH-CAP con il metodo IRMA della Scantibodies Laboratory, Inc.-Santee(CA); il PTH-CIP si ottiene per differenza tra i due. Il iPTH è stato determinato con il metodo IRMA della Biorad-S.J.Capistrano(CA). In un sottogruppo di 30 pazienti sottoposti a dialisi, il PTH totale ed il PTH-CAP sono stati dosati al momento della loro inclusione nello studio (tempo 0), e ad intervalli di 15 giorni (tempo 1 e 2) dopo aver modificato la strategia terapeutica.

*Risultati:* il coefficiente di correlazione calcolato tra il PTH totale ed il iPTH è risultato essere  $r = 0.971$  mentre tra il PTH-CAP ed il iPTH  $r = 0.979$ . I valori mediani del PTH totale, PTH-CAP, iPTH sono rispettivamente di 115 pg/ml, 74 pg/ml e 148 pg/ml. L'iPTH è sovrastimato del 22% rispetto al PTH totale (il test di Wilcoxon per dati appaiati ha fornito un valore di  $p = 0.00002$ ) mentre è sovrastimato del 50% rispetto al PTH-CAP. Per i 30 pz. dializzati, il rapporto CAP/CIP calcolato tra i valori mediani al tempo 0, 1, 2, è risultato di 1.97, 1.51, 1.39, rispettivamente. Il confronto tra i valori mediani di PTH-CAP, PTH totale, calcolati agli stessi intervalli di tempo, sono risultati non statisticamente significativi.

*Conclusioni:* l'evidente sovrastima del PTH che può realizzarsi con metodi che non dosano la molecola intera dell'ormone può porre problemi per il corretto inquadramento e trattamento farmacologico dei pz. con iperparatiroidismo secondario a IRC. La stima del rapporto CAP/CIP può aiutare a scegliere se somministrare il calcitriolo per os dopo dialisi o infonderlo in vena, tenendo in considerazione anche i livelli di PTH-CAP.

## VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEL CITRATO DI POTASSIO NELLA CALCOLOSI URINARIA RECIDIVANTE

Spagnuolo G., Farina C., Galluccio A., \*Nocerino B., \*Imbimbo C., \*Papa S., \*Lotti T.

Dip. Assistenziale di Medicina di Laboratorio, Università "Federico II", Napoli; \*Dip. di Urologia e Nefrologia, Università "Federico II", Napoli.

**Introduzione:** L'ipocitraturia costituisce un reperto di comune riscontro nei pazienti affetti da calcolosi renale.

E' noto, infatti, che i citrati rappresentano dei potenti inibitori della cristallizzazione. Ciò è stato dimostrato da numerosi studi in vitro e in vivo. Non sono ancora noti, però, gli effetti di una terapia a lungo termine con queste sostanze, e soprattutto non è nota la reale efficacia di tale terapia nel prevenire eventuali recidive in pazienti affetti da calcolosi idiopatica. Il nostro studio si propone di sondare alcuni di questi aspetti.

**Materiali e Metodi:** Abbiamo arruolato 100 pazienti affetti da calcolosi recidivante sottoponendoli a dosaggio della citraturia delle urine delle 24 h (metodo UV enzimatico-colorimetrico). I pazienti presentanti ipocitraturia (43 pazienti) sono stati a loro volta suddivisi in due gruppi: Gruppo A composto da 23 pazienti, trattati con 2 g/die di citrato di potassio (corrispondenti a 19,58 mEq di ione citrato e 19,58 mEq di ione potassio). Gruppo B composto da 20 pazienti, trattati con placebo. La comparsa di eventuali recidive nei pazienti (tutti stone-free all'inizio del trattamento) veniva monitorata mediante controlli ecografici effettuati a scadenze regolari.

**Risultati:** Sono risultati ipocitraturici 43 pazienti su 100 esaminati (valori  $< 407$  mg/24h). Dopo un anno di follow up la percentuale di recidive nel gruppo A era di 2/23 (8,6%) mentre nel gruppo B era di 5/20 (25%).

**Conclusioni:** I risultati preliminari del nostro studio appaiono incoraggianti. Dai dati sinora raccolti abbiamo potuto osservare che in tutti i pazienti che hanno assunto il citrato di potassio alle dosi su indicate si è osservato un netto miglioramento dei valori della citraturia delle 24 h. A tale miglioramento corrisponde una minore percentuale di recidiva ed inoltre anche l'intervallo libero da malattia risulta allungato, specie nei pazienti considerati (in base all'anamnesi e ai dati in nostro possesso) particolarmente inclini alle recidive.

### Bibliografia:

Lee YH Huang WC Tsai JK. The efficacy of potassium citrate based medical prophylaxis for preventing upper urinary tract calculi: a midterm followup study. J Urol, 1999 May, 161:5, 1453-7

PREVALENCE OF COELIAC DISEASE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Tumini S., Anzellotti M.T., Pomilio M.P., Di Luzio R., Febo F., Faricelli R.\*, Gioia S.\*, Filippi G\*, D'Alleva L.\*, Martinotti S.\*, Chiarelli F.

Department of Pediatrics, Clinical Patological Laboratory\*, University of Chieti, Italy

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is associated with different autoimmune diseases, particularly coeliac disease and autoimmune thyroiditis. The aim of this study is to evaluate the prevalence of coeliac disease in a population of children and adolescents with T1DM.

195 children and adolescents with T1DM (92 males; 103 females), age range from 3 yrs to 17.11 yrs attending the Diabetes Unit at the Department of Pediatrics in Chieti, Italy were studied; they were screened yearly for autoimmune disorders; IgA antigliadin (AGA) test, IgA or IgG anti-endomysial (EMA) test and Transglutaminase IgA (TGA) on serum sample were evaluated; AGAs of both IgA and IgG were measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA); AGA-IgG was measured in only one patient with isolated IgA deficit. EMA was determined by immunofluorescence (IF) on unfixed cryostat sections of distal monkey oesophagus. TGA was humane IgA antibodies. Patients with positive antibodies test repeated the test twice.

The histologic diagnostic evidence was obtained by small bowel biopsy during EGDS.

Nine children and adolescents had positive antibodies and 8 had positive antibodies also at the second test. EMA was positive in 6 of 8 patients (75%); AGA was positive in 1 of 8 patients (12.5%) and TGA in 2 of 8 patients (25%). The duodenal biopsy was always positive.

In this study prevalence of coeliac disease was 4.1%.

Screening for autoimmune disorders was able to detect 8 patients with coeliac disease in a preclinical phase.

Bibliography

1. Schober E., IDDM and coeliac disease. *Diabetes Care* 1994;17: 1549-50
2. Cacciari E, Prevalence and characteristics of coeliac disease in type 1 diabetes mellitus. *Acta paediatr Scand* 1987; 76: 671-2
3. Lorini R, IgA antibodies to gliadin, reticulum and endomysium for coeliac disease screening in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr* 1994; 124: 994

ODC ACTIVITY IN RELATION TO MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF COLORECTAL CARCINOMA

Linsalata M., Notarnicola M., Di Leo A.

Laboratory of Experimental Biochemistry, IRCCS "S.de Bellis" Castellana Grotte (BA)

Morphologically, colorectal cancer is not a homogeneous disease entity. It has suggested the existence of two different types of colorectal carcinoma characterized by divergent growth pattern designated as polypoid growth type and non polypoid growth type or flat type. Moreover, a different cellular proliferation activity with different tumor progression behaviour between polypoid and flat type have been reported. Ornithine Decarboxylase (ODC) is the first and rate-limiting enzyme in the polyamine biosynthetic pathway, polycationic compounds normally required for the cellular proliferation and differentiation. Our previous works had demonstrated an involvement of ODC in neoplastic transformation of gastrointestinal tract (1). Therefore, on the basis of these suggestions, in this study we evaluate the ODC activity in polypoid and flat types of colorectal carcinoma.

Patients and Methods: a total of 28 colorectal tumors were obtained from colorectal cancer patients who underwent colectomy at Surgery Division of our Institute. Samples of colonic normal mucosa and neoplastic tissue were collected upon excision of the tumor and tissue specimens were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The tumors were histologically diagnosed as adenocarcinomas and macroscopically classified in polypoid and flat types. ODC activity was measured in duplicate by using a radiometric technique in which the amount of  $^{14}\text{CO}_2$  liberated from DL-[1- $^{14}\text{C}$ ] ornithine was estimated. Values expressed as  $\text{pmol } ^{14}\text{CO}_2/\text{hr/mg protein}$  (median and range). The Statistical analysis was assessed by Wilcoxon rank test and Mann-Whitney test. Results: There were 13 polypoid tumors and 15 flat tumors. ODC activity was higher in neoplastic tissue of both polypoid and flat cancer than in surrounding normal mucosa: 106 (7-1336) vs 8.5 (1-60) and 23.5 (1-120) vs 15.5 (5-99) respectively. This difference was statistically significant ( $p < 0.001$ ) in polypoid type of colorectal cancer. Moreover, the ODC activity was significantly ( $p = 0.04$ ) higher in polypoid type than in flat type of colorectal cancer samples. Conclusion: This finding suggest that ODC activity is involved in transformation of polypoid tumors and these tumors have a different proliferative behavior respect to flat type of cancers. This observation may imply that patients with different morphological characteristic of colorectal carcinoma may have a different outcome.

(1) M. Linsalata et al. *Dis Colon Rectum* 1993;36:662-667.

VALUTAZIONE DELL'UREA BREATH TEST CON <sup>13</sup>C NELL'INCIDENZA DELL'INFEZIONE DA HELICOBACTER PYLOR (H.P.) IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TERAPIA ERADICANTE

Cleopazzo E., Varraso L., Brescia V., Lovero R., Mileti A., Petronelli M., Portincasa P., Pansini N.

U.O. Patologia Clinica I, Azienda Ospedaliera Policlinico, Piazza G.Cesare 11, Bari

L'accuratezza diagnostica dell'urea breath test con <sup>13</sup>C rappresenta un ottimo ausilio per la diagnosi dell'infezione da H.P. ed il monitoraggio della terapia.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'incidenza della presenza di H.P. mediante l'urea breath test con <sup>13</sup>C in pazienti sottoposti a terapia eradicante.

**Materiali e Metodi:**

Sono stati studiati in tre mesi n° 175 pazienti con già accertata diagnosi di infezione da H. P. (biopsia positiva, urea breath test positivo) già sottoposti a terapia eradicante per un periodo non inferiore a un mese. Il protocollo di valutazione prevedeva 1) un campione di espirato basale 2) somministrazione di 75 mg di urea marcata con carbonio <sup>13</sup>C disciolta in 200 ml di succo di arancia non zuccherato 3) un campione di espirato dopo 30 minuti dalla somministrazione dell'urea L'analisi dell'espirato è stata eseguita mediante l'utilizzo dell'analizzatore all'infrarosso per isotopi stabili IRIS (Byk Golden Italia) la valutazione della risposta viene effettuata in DOB ( $\delta$  over baseline) (v.n. < 5%). Nei 15 giorni precedenti l'esecuzione del test il paziente non doveva: assumere farmaci (antibiotici, antinfiammatori, antiacidi, inibitori della pompa protonica, H<sub>2</sub> antagonisti), fumare da 24 ore e doveva essere a digiuno da due ore.

**Risultati:**

**Età:**

Mediana 46 (Range di età 8 - 71) 95 CI della mediana 41 - 55 95th - 69

N°	Percentuale	Sesso	Mediana	Range	95 CI	95 <sup>th</sup>
Pazienti				età	mediana	
70	40%	M	41	8-71	34-49	67
105	60%	F	42	8 - 78	36-46	70

**Positivi n° 33 (18.85%)**

N°	Percentuale	Sesso	Mediana	Range	95 CI	95 <sup>th</sup>
Pazienti				età	mediana	
70	66.67%	M	36	8-71	9-43	69
105	33.33%	F	21	8-70	9-47	69

**Negativi n° 142 (81.15%)**

N°	Percentuale	Sesso	Mediana	Range	95 CI	95 <sup>th</sup>
Pazienti				età	mediana	
70	47.9%	M	44	8-71	36-51	70
105	52.1%	F	36	8-78	25-42	71

Conclusioni: i risultati ottenuti hanno confermato i dati di Letteratura riferenti la percentuale totale (10 - 20 %) di pazienti positivi post - terapia eradicante, inoltre i nostri dati evidenziano una prevalenza dei pazienti positivi per il sesso maschile. Pertanto l'assoluta tollerabilità e la facilità di esecuzione lo rende utile come screening per i pazienti sottoposti, ad il follow - up a lungo termine per la terapia eradicante, in particolare per soggetti di età pediatrica.

NEFROPATIA, MICRO E MACROANGIOPATIA IN UNA POPOLAZIONE DI DIABETICI DI TIPO 2: RUOLO DELL'ALBUMINURIA

Floreani M.<sup>1</sup>, Casadei A.<sup>2</sup>, Fanolla A.<sup>3</sup>, Cosio G.<sup>1</sup>, Marchesi M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Biochimica Clinica, <sup>2</sup>Reparto Medicina Prima, Azienda Sanitaria di Bolzano, <sup>3</sup>Osservatorio Epidemiologico, Provincia Autonoma di Bolzano

INTRODUZIONE. Scopo del lavoro è stato quello di studiare una popolazione di pazienti diabetici non insulino-dipendenti (NIDDM), valutare l'incidenza dell'arteriopatia periferica (AOP) e cercare la relazione con retinopatia, parametri anamnestici e laboratoristici.

MATERIALI E METODI. *Popolazione:* 150 pazienti diabetici NIDDM divisi in due gruppi: Gr. 0 (n=104) età media 60 anni ed assenza di AOP e Gr. 1 (n=46) età media 64 anni e presenza di AOP (valutata nelle arterie degli arti inferiori con metodica Doppler). *Dosaggi laboratoristici:* glicemia, creatinina, colesterolo, trigliceridi (SynchronCX9, Beckman), cistatina, albuminuria, alfa1-microglobulina urinaria (BNII, Dade-Behring) ed emoglobina glicosilata (HPLC, Eurogenetics).

RISULTATI. L'AOP tende a manifestarsi in media dopo circa 14 anni di malattia ed entro 20 anni è presente nel 43% dei pazienti. Non si osservano differenze (test t) nei due gruppi riguardo: età, glicemia, colesterolo, trigliceridi e ipertensione, mentre si riscontra significatività per: età diabete (p=0.000), creatinina (p=0.007), cistatina C (p=0.001), albuminuria (p=0.000), alfa1-microglobulina (p=0.032), emoglobina glicosilata (p=0.005), presenza di retinopatia (p=0.000) e fumo di sigarette. Nel gruppo con albuminuria negativa il 14.3% dei pazienti presenta una AOP, nel gruppo con microalbuminuria il 28.9%, mentre nel gruppo con macroalbuminuria il 51.1% (p=0.000).

CONCLUSIONI. Nel nostro studio la prevalenza dell'AOP è risultata più elevata nei pazienti che presentano micro e macroalbuminuria rispetto a quelli senza segni laboratoristici di nefropatia. Si è inoltre osservato che le complicanze croniche del diabete (retinopatia, nefropatia e arteriopatia) tendono a presentarsi associate negli stessi pazienti. Queste considerazioni hanno portato allo studio dell'albuminuria non solo nella nefropatia ma anche nella micro e macroangiopatia. La presenza di albuminuria non è quindi solo un marker di nefropatia ma può essere considerato un indice di compromissione vascolare generalizzata (1).

BIBLIOGRAFIA. 1) Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BE. *The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus.* Arch Intern Med 2000 Apr 24; 160(8): 1093-100

## L'ACE NEI PAZIENTI CON SARCOIDOSI IN FASE ATTIVA

Luchetti B., Lucchetti A., \*Fazzi P., \*\*Monti S., \*Troilo S., Innocenti B., Rossi L.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche I, Azienda Ospedaliera Pisana; \*Dip. Cardiotoracico, Sezione Pneumologia, Università di Pisa, \*\*Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Pisa

*Scopo del lavoro:* La sarcoidosi è una malattia sistemica con manifestazioni cutanee e viscerali a decorso cronico, prodotta da un agente patogeno non identificato. Livelli circolanti di Lisozima, D Dimero e ACE (Angiotensin Converting Enzyme) sono stati descritti recentemente come markers della sarcoidosi in fase attiva. Risulta inoltre che l'aumento di ACE nel siero sia in rapporto con il grado di attività della malattia (in corso di efficace trattamento cortisonico si possono rilevare netti cali dell'attività enzimatica). Scopo di questo lavoro è stato l'assegnare una reale utilità a questi indicatori, ed in particolare all'ACE, nel monitoraggio della sarcoidosi.

*Materiali e metodi:* 32 pazienti, non in trattamento steroideo, con una precedente storia di sarcoidosi (età media  $42 \pm 9$  anni, 19 femmine, 23 maschi), sono stati sottoposti ad una valutazione standard che includeva una visita medica generale, un test di funzionalità polmonare (PFTs) con la misurazione della capacità di diffusione al CO (DLCOsb), RX del torace e scintigrafia polmonare con Gallio 67. La captazione parenchimale con Gallio 67 è stata valutata con metodo di Line (score 50-400); successivamente è stata valutata la captazione dell'ilo polmonare (score 0-100). In questi pazienti sono stati eseguiti dosaggi per la determinazione di Lisozima, D Dimero e ACE. Per l'ACE è stata utilizzata una metodica colorimetrica manuale (Diacron), adattata ed automatizzata su analizzatore Modular (Roche Diagnostici). Grazie a questo accorgimento è possibile evitare lunghe e noiose preparazioni manuali ed eseguire il test in meno di 20 minuti.

*Risultati:* Dai risultati della scintigrafia polmonare sono risultati positivi per sarcoidosi in fase attiva 17 (53%) dei 32 pazienti. Questi differivano dagli altri prevalentemente per sintomatologia respiratoria, valutazione radiografica e modificata DLCO. Dei 17 pazienti positivi, 4 (23%) presentavano un D Dimero positivo, 9 (53%) il lisozima superiore ai valori normali. Diversamente la scintigrafia polmonare correlava con i livelli di ACE circolanti ( $R=0.7$ ,  $P=0.004$ ).

*Discussione e conclusioni:* Lisozima e D Dimero non sono sensibilmente significativi nell'indicare una sarcoidosi in fase attiva; l'ACE, oltre a fornire un'indicazione sulla progressiva attività, risulta essere un'ottimo indicatore nel riflettere la massa del granuloma attivo. L'associazione con altri parametri laboratoristici, quali il fattore reumatoide, o clinici (ipergammaglobulinopatia generalizzata) ne fanno un buon marcatore della sarcoidosi in fase attiva.

PLASMA HOMOCYSTEINE IS INFLUENCED BY MTHFR GENOTYPE, VITAMIN B<sub>12</sub> AND FOLATE, IN HEMODIALYSIS PATIENTS

°Dessi M., ^De Angelis S., °Casciani S., ^Splendiani G., \*Pastore A., ^Tullio T., °Ruggia R., °Liberatoscioli L., \*°Federici G., °Cortese C.

°Dip. Medicina di Laboratorio e ^ Nefrologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "Tor Vergata", Viale Oxford 81 -00133- Roma, \*Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Piazza S.Onofrio 4, 00165 Roma

Cardiovascular disease (CVD) is the major cause of death both in the general population and in patients with end-stage renal disease (ESRD). In particular in hemodialysis (HD) patients, even after stratification by age, gender, race and presence of diabetes, CVD mortality is 10 to 20 times higher than in the general population. The excess risk of CVD is due in part to a higher prevalence of established risk factors. However, unique renal-related risk factors, are likely to contribute to this excess CVD risk(1).

Hyperhomocysteinemia, a well-recognized cardiovascular risk factor, is frequent in HD subjects. A common polymorphism in the 5,10- methylenetetrahydrofolate (MTHFR) gene is associated with homocysteine (Hcy) elevated levels (2). In the general population a C to T substitution at nucleotide 677 generates a thermolabile variant of this enzyme which, in the presence of sub-optimal levels of folates or Vit B<sub>12</sub>, leads to elevated Hcy levels. We examined whether MTHFR polymorphism, vitamin B<sub>12</sub> and folate are capable of influencing Hcy concentrations also in HD patients. Effects of MTHFR genotype, vitamin B<sub>12</sub>, and folate on plasma Hcy levels were examined in 21 HD subjects . The genotype frequency were 0.38, 0.43 and 0.19 for CC CT and TT carriers respectively. The corresponding mean Hcy levels in  $\mu\text{M/L}$  ( range) were 22.7 (16-34), 53.1(14.5-179), 122.6 ( 27-248). On ANOVA these differences were statistically significant ( $p<0.0093$ ). Both folates and Vit B<sub>12</sub> were highly correlated with Hcy levels ( $p<0.0006$  and  $<0.0059$ ). On stepwise discriminant analysis only the MTHFR genotype and folates were associated with Hcy levels.

These preliminary data seem to indicate that a) the almost five to tenfold increase of Hcy levels in HD subjects when compared to a healthy population might represent a major risk for CVD b) The MTHFR polymorphism is highly influencing Hcy levels also in these patients c) that appropriated supplementations of folates and perhaps of Vit B<sub>12</sub> is highly warranted.

1 - Bostom AG et al, 1999, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:891-900

2 - Bachmann J. et al., 1995, *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 121-125.

## AUTOMAZIONE DELLA FASE PREANALITICA: VALUTAZIONE COSTI/BENEFICI

Tagliazucchi M., Tizzanini W., Atrotto G., Guidetti F., Carbonieri A.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena, via del Pozzo 71, 41100 Modena (Italia)

La fase preanalitica è un momento particolarmente critico nella produzione del dato di laboratorio per l'elevato numero di rischi di varia natura a cui sono sottoposti gli operatori e i campioni.

Un altro elemento di criticità è costituito dal condizionamento che l'output di questa fase induce sulla qualità del prodotto a valle e che impone di concentrare in questo momento risorse ed attenzioni rivolte a prevenire, se non eliminare, tutte le N.C. che compromettono la corretta ed efficiente conclusione del percorso analitico.

Il ricorso alla automazione può costituire la soluzione a numerose di queste problematiche.

Viene descritta l'esperienza del nostro Servizio, che ha adottato il sistema di preanalitica della ditta ROCHE Diagnostics S.p.A. costituito da: un PSD1 per lo smistamento, la stappatura e lo stoccaggio dei campioni della routine, un VSII per la aliquotazione dei sieri e il software PSM per la gestione informatizzata delle provette. Una analisi costi/benefici, ha portato a confrontare la situazione prima e dopo su tre gruppi di indicatori:

- Qualità
- Spesa corrente
- Risorse umane

Stante la eterogeneità degli indicatori, non è stato possibile ottenere un bilancio complessivo dei dati rilevati. A nostro parere gli aspetti di recupero di risorse umane e di miglioramento della qualità in generale hanno compensato la maggiorazione di spesa corrente inevitabilmente legata all'utilizzo di una tecnologia avanzata come quella adottata. Sono stati creati degli indicatori economici nel tentativo di monitorare nel tempo il sistema e di ottenere elementi per confrontare soluzioni tecnologiche equivalenti.

Nel corso della implementazione del sistema sono inoltre stati individuati alcuni punti di forza non completamente sfruttati nella nostra realtà operativa, ma anche alcuni punti di debolezza e qualche aspetto suscettibile di miglioramento.

### Bibliografia:

La valutazione economica degli interventi sanitari.

Jefferson T.; De Micheli V.; Mugford M..

Il Pensiero Scientifico Editore

BMJ Publishing Group

## VALUTAZIONE DI DIFFERENTI METODICHE IN VITRO DI DETERMINAZIONE DELLE IGE SPECIFICHE PER ALLERGENI INALANTI NEL BAMBINO ALLERGICO

Ricci G\*, Capelli M.\*\*\*, Miniero R.\*\*\*, Menna G\*, Zannarini L.\*\*\*, Dillon P.§, Masi M.\*

\*Dipartimento di Pediatria, Università Bologna,  
\*\*Laboratorio Centralizzato, Policlinico S. Orsola-Malpighi,  
Bologna; §Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY

*Scopo dello studio:* valutare l'affidabilità di differenti tests allergometrici (Skin Prick Test "SPT", UniCAP® System – Pharmacia, ADVIA® Centaur®), nella determinazione delle IgE specifiche per allergeni inalanti in soggetti atopici, con sintomatologia clinica.

*Materiali e metodi:* sono stati considerati 151 soggetti, afferenti al Centro di Allergologia della Pediatria dell'Università di Bologna, di età variabile dai 4 mesi ai 14 anni (media 70 mesi; M/F 89/62), con manifestazioni allergiche: 76 con esclusivo interessamento cutaneo (Dermatite Atopica e/o Orticaria e/o Sindrome Orale Allergica); 40 con allergia respiratoria (31 con Asma, 9 con Rinite Allergica) e 35 con entrambe.

Test allergometrici: gli SPT sono stati condotti con metodica standardizzata utilizzando estratti allergenici della ditta Lofarma di Milano. Gli allergeni testati sono stati: pollini di *Graminacee*, epitelio di gatto, *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. Il siero del prelievo venoso eseguito alla prima visita è stato separato in campioni di 1,5-2 ml, che contraddistinti con il proprio identificativo alfanumerico sono stati poi stoccati a -20°C. Sono state determinate le IgE specifiche per gli allergeni scelti: *D. Pteronyssinus* (d1), *D. Farinae* (d2), epitelio di gatto (e1), *Cynodon dactylon* (g2), *Phleum pratense* (g6), mediante l'UniCAP® System – Pharmacia, e l'ADVIA® Centaur®; per entrambe le metodiche il valore soglia, di positività è > 0.35 kU/L. I dosaggi delle IgE specifiche, nel caso delle pollinosi, sono stati correlati alla presenza di clinica respiratoria allergica; per essere considerati positivi era sufficiente che il valore di almeno 1 dei due allergeni testati (g1- g6) fosse sopra la soglia di positività. Analoga valutazione è stata fatta per gli allergeni degli acari maggiori (d1 – d2).

La media geometrica dei valori delle IgE specifiche è significativamente più bassa nei soggetti senza clinica allergica, rispetto ai sintomatici. Dal 10 al 25 % dei soggetti con Dermatite Atopica, mostrano una sensibilizzazione ad allergeni inalanti, in particolare alle *Graminacee*. La prima classe di sensibilizzazione (0,35-0,7 kU/L) è raramente associata a quadri clinici allergici sia per gli acari che per l'epitelio di gatto.

L'UniCAP® System ha mostrato una più alta sensibilità rispetto all'ADVIA® Centaur®. Nel complesso sensibilità, specificità, valore predittivo negativo e valore predittivo positivo, non hanno mostrato differenze statisticamente significative fra i due tests allergometrici.

## VALUTAZIONE DELL'ISOENZIMA OSSEO DELLA FOSFATASI ALCALINA

Bassi L., Dolci D., Fantini M.

Azienda Istituti Ospitalieri, Laboratorio Analisi, Viale Concordia n°1, 26100 Cremona

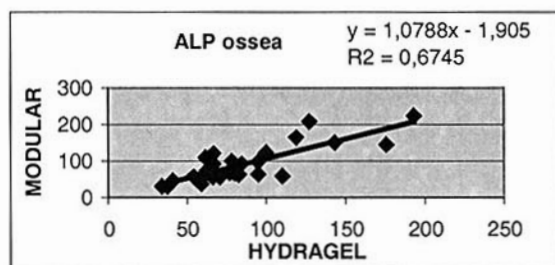
SCOPO

Nel nostro laboratorio la ALP ossea è determinata in attività come differenza tra l'attività dell'ALP totale e quella dopo precipitazione del siero con lectina da germe di grano. Si è voluto sperimentare per praticabilità e accuratezza analitica anche il metodo elettroforetico e quindi verificare se il valore ottenuto in attività fosse correlato con quello calcolato dalla percentuale dell'isoenzima osseo ricavato dal tracciato elettroforetico e riferito all'attività totale dell'ALP.

MATERIALI E METODI

Sono stati testati 16 campioni di pazienti in dialisi e 16 di pazienti sani con i due metodi:

- 1) ALP totale ed ossea dosate in attività su Modular e rispettivamente con kit ALP-DEA e BONE-ALP
- 2) ALP ossea in % con elettroforesi in gel di agarosio Hydragel ISO-PAL Sebia (precipitante lectina) e riportata al valore in attività utilizzando il dato dell'ALP totale da Modular.

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti risulta che è poco corretto estrapolare il dato di attività dalla percentuale elettroforetica (calcolo peraltro eseguito in un nostro reparto). Il test elettroforetico, rispetto al metodo in attività, richiede un tempo di esecuzione maggiore (pur essendo semiautomatico), l'esecuzione per seduta analitica di soli 7 pazienti, la successiva lettura densitometrica e una buona interpretazione del tracciato. Le informazioni che si possono ottenere dall'elettroforesi sono certo più complete potendo separare tutti gli isoenzimi presenti nel campione indipendentemente dalla attività, ma in rapporto alle caratteristiche di struttura. La scelta quindi dipende dalla completezza di informazioni anche cliniche che si vogliono ricavare dall'esame.

BIBLIOGRAFIA: Moro L., Modrickyc C., Bettiga P. "I marcatori biochimico-clinici nella fisiopatologia ossea"- Edizioni Sorbona, Milano 1994

## VALUTAZIONE DI UN NUOVO NEFELOMETRO PER LA MISURA DELLE PROTEINE DEL PLASMA

Infusino I., Luraschi P., Franzini C.

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

La tecnica immunonefelometrica è considerata la tecnica di elezione per la misura delle proteine del plasma. In questo lavoro abbiamo valutato le caratteristiche analitiche di un nuovo strumento automatico (Delta, Radim) per tali misure, effettuando la valutazione di ciascuna caratteristica con l'uso di sieri freschi, derivanti dalla routine. Si sono incluse nella valutazione le immunoglobuline (IgG, IgA ed IgM), la transferrina (TRF) e la proteina C-Reattiva (CRP), come proteine presenti a differente concentrazione e di diverso significato clinico. Misure di confronto sono state effettuate in immunoturbidimetria (TRF e CRP; strumento Modular, Roche) e immunonefelometria (IgG, A, M e CRP; strumento Image, Beckman Coulter). Si sono registrati i seguenti risultati. Imprecisione, come CV% globale a tre livelli di concentrazione: IgG, 3,7-5,8%; IgA, 5,6-8,8%; IgM, 3,9-7,3%; TRF, 3,9-9,7%; CRP, 10,5-15,6%. Il profilo di imprecisione globale (imprecisione / concentrazione, per tutte le proteine) evidenziava la correlazione inversa tra imprecisione e concentrazione. La stabilità della calibrazione è risultata valida per almeno 36 giorni. La linearità è risultata valida almeno per gli intervalli: IgG, 469-1662 mg/dL; IgA, 33-453 mg/dL; IgM, 34-292 mg/dL; TRF, 135-281 mg/dL; CRP, 1,8-14,3 mg/dL. La analisi della regressione/correlazione con i metodi di confronto su 120 campioni di siero ( $y$ =strumento valutato;  $x$ =strumento di confronto; valori in mg/dL) ha dato: IgG,  $y=65,0+0,88x$ ,  $r=0,981$ , intervallo di valori 254-3840; IgA,  $y=10,1+0,81x$ ,  $r=0,977$ , intervallo di valori 6-1060; IgM,  $y=4,4+0,91x$ ,  $r=0,975$ , intervallo di valori 5-785; TRF,  $y=-2,2+0,95x$ ,  $r=0,961$ , intervallo di valori 73-522; CRP (confronto con Image),  $y=-0,4+1,13x$ ,  $r=0,989$ , intervallo di valori 0,1-39,8; CRP (confronto con Modular),  $y=-0,6+0,99x$ ,  $r=0,983$ , intervallo di valori 0,1-41,4. La torbidità artificialmente indotta dall'aggiunta di Intralipid (NCCLS publication EP7-P, 1986) non influenzava sostanzialmente i valori misurati per le cinque proteine studiate. I dati ottenuti permettono di concludere, globalmente, per una qualità analitica "stato dell'arte" dello strumento valutato.

FER-LATEX(X2) "SEIKEN": VERIFICATION OF ASSAY PERFORMANCE ON OLYMPUS AU 640.

Signò P., Barassi A., Cocomazzi G., Peruggia E., Melzi d'Eril G.V.

Laboratorio di Analisi, Ospedale di Circolo, Università dell'Insubria, Varese.

FER-Latex (X2) "SEIKEN" (Denka Seiken) is a latex-enhanced turbidimetric immunoassay, adaptable on different automated chemistry analysers, to measure ferritin levels in serum and plasma samples. The aim of the study is to value the system performance on Olympus AU 640 and to compare the data with those obtained by a well-experienced nephelometric method (Beckman Image Assay – Beckman Coulter). Performance evaluation on Olympus AU 640 included within and among-run imprecision, linearity tests, analytical and functional sensitivity. Comparison to the nephelometric system Beckman Image, performed by 80 samples, in duplicate, ranging from 5 to 1000 ng/mL, gave good results ( $r = 0.99$ ; slope = 1.06). Within-run and among-run imprecision, at the 3 different levels of 25, 175 and 600 ng/mL, was satisfactory (medium within-run CV 4.95%; medium among-run CV 4.92%) as well as linearity tests ( $0.94 < r < 0.99$ ;  $1.02 < \text{slope} < 1.12$ ). Analytical sensitivity (7 ng/mL) and functional sensitivity (8 ng/mL: the lowest limit of ferritin level which showed CV < 20%) confirmed the quality of the methodology. This last study was performed by 20 measurements of physiological saline and of six serial dilution of a ferritin pool ranging from 2 to 12 ng/mL. The new system range is 8-1000 ng/mL. Samples exceeding this level must be diluted with physiological saline. Calibration curve is stable for 1 month; a new calibration is advisable at every change of reagents, independently of lot-number. In general, the FER-Latex (X2) "SEIKEN" evidenced good correlation to a traditional nephelometric system and a very good analytical performance on Olympus AU 640. This is an example of instrument consolidation without worsening in quality performance, a very important goal for every clinical laboratory.

- Westgard JO. Points of care in using statistics in method comparison studies. Clin. Chem. 1998; 44: 2240-2242.

AFFIDABILITÀ ANALITICA DEL DOSAGGIO DEL CYFRA21-1 E DEL CA 72-4 CON AUTOANALIZZATORE ELECSYS

Torelli F., Galeazzi M., Recchioni A., Tocchini M..

Laboratorio di Analisi, Azienda Ospedaliera Umberto I, Ancona, Italy.

Abbiamo valutato l'affidabilità analitica del dosaggio dei marcatori tumorali Cyfra 21-1 e Ca 72-4 su analizzatore automatico ELECSYS 2010 della Roche Diagnostics.

La precisione intra-serie è stata valutata campionando 15 volte successive, nella medesima seduta, 2 sieri di controllo a bassa e ad alta concentrazione sia per il Cyfra 21-1 che per il Ca 72-4 (Tab.1)

La precisione inter-serie è stata valutata processando, per 30 giorni consecutivi gli stessi sieri di controllo precedentemente aliquotati e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Tab.2)

Tabella 1

Precisione intra-serie

Cyfra 21-1	$X \pm IDS$	CV %
C1	$3.7 \pm 0.07$	2.0
C2	$32.4 \pm 0.37$	1.1
Ca 72-4		
C1	$4.9 \pm 0.09$	2.0
C2	$53.9 \pm 0.76$	1.4

Tabella 2

Precisione inter-serie

Cyfra 21-1	$X \pm IDS$	CV %
C1	$3.6 \pm 0.12$	3.4
C2	$31.4 \pm 1.3$	4.1
Ca 72-4		
C1	$4.7 \pm 0.21$	4.5
C2	$50.8 \pm 2.4$	4.7

I recuperi medi per il Ca 72-4 e per il Cyfra 21-1 sono risultati essere rispettivamente del 100% e del 98%.

E' stata valutata anche la linearità del dosaggio dei due marcatori, per il Ca 72-4 si è ottenuta la seguente retta di regressione:  $y = 0.09 + 1.0x$  con  $r = 0.99$ , mentre per il Cyfra21-1:  $y = 0.6 + 0.9x$  con  $r = 0.99$ .

Per entrambi i marcatori è in corso di valutazione il confronto con il metodo RIA (Cyfra 21-1, Biochem Immunosystems; Ca 72-4 Byk Gulden Italia) utilizzato precedentemente nel nostro laboratorio.

## VALUTAZIONE COMPARATIVA DI DUE CONTAGLOBULI

Brambilla S., Cambielli F., Moraschinelli I\*, Grazioli V.

Laboratorio Analisi, Istituto Clinico Humanitas, Via Manzoni 56, 20089 Rozzano (Milano) e \*Diploma Universitario per Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, Università dell'Insubria, Varese.

Nell'ambito del rinnovo della strumentazione, nel nostro laboratorio si è programmato di cambiare il contaglobuli. La scelta è caduta su strumento diverso da quello esistente: si è provveduto pertanto ad una estensiva valutazione comparativa dei due strumenti ai fini di valutare le differenze derivanti dall'operazione. Entrambi gli strumenti, "vecchio" (Cell-Dyn 4000, Abbott) e "nuovo" (LH-750 Coulter Analyzer, Beckman Coulter) sono basati su principi equivalenti, includenti il principio impedenziometrico per i conteggi di cellule e la derivazione dei valori di ematocrito (Hct) dalla funzione di distribuzione dei volumi eritrocitari. La valutazione è stata effettuata mediante misura comparativa di 184 campioni di sangue caratterizzati da ampia dispersione dei valori dei differenti parametri ematologici (WBC: 0,4-36,2  $10^3/\mu\text{L}$ ; RBC: 2,30-5,62  $10^6/\mu\text{L}$ ; Hb: 7,0-16,1 g/dL; MCV: 68-117 fL; Plt: 1-671  $10^3/\mu\text{L}$ ; RDW: 10-22%; Hct: 22-50%). Per l'analisi statistica si è utilizzata la regressione lineare ( $y=\text{nuovo}$ ;  $x=\text{vecchio}$ ) secondo il modello della componente principale standardizzata (Feldmann U. J Clin Chem Clin Biochem 1981;19:121-37) e l'analisi della distribuzione delle differenze ( $d=y-x$ ). Si sono ottenuti risultati indicativi di buona concordanza per: WBC ( $y=-0,1+0,99x$ ;  $r=0,995$ ;  $d=-0,2\pm 0,5$ ); RBC ( $y=0,1+0,94x$ ;  $r=0,981$ ;  $d=-0,1\pm 0,2$ ); MCV ( $y=-2,1+1,04x$ ;  $r=0,952$ ;  $d=1,0\pm 1,9$ ); Plt ( $y=0,8+1,03x$ ;  $r=0,975$ ;  $d=7,8\pm 28,1$ ); Hct ( $y=0,3+0,97x$ ;  $r=0,988$ ;  $d=-0,8\pm 1,1$ ). Qualche discordanza si è registrata nel caso di Hb ( $y=-0,4+1,06x$ ;  $r=0,996$ ;  $d=0,2\pm 0,2$ ) e di RDW ( $y=-1,0+1,22x$ ;  $r=0,974$ ;  $d=1,8\pm 0,7$ ). Nel caso di Hb, tuttavia, intercetta e pendenza si compensano abbastanza bene al di sotto di circa 12 g/dL, che rappresenta la zona critica ai fini clinici; in effetti su tutto l'arco dei valori la differenza  $y-x$  (intervallo di confidenza da -0,2 a +0,6 g/dL) non è risultata significativamente diversa da 0. Per quanto concerne RDW il compenso di pendenza e intercetta avviene solo a valori non riscontrabili (inferiori a 5%); la differenza  $y-x$  (intervallo di confidenza da 0,4 a 3,2%) è in effetti significativamente diversa da 0. In conclusione la nostra valutazione ci permette di effettuare la sostituzione dell'apparecchio senza modificare l'interpretazione clinica dei risultati se non per quanto concerne RDW che si innalza di poco ma significativamente (+0,2%). Per questo problema, per il quale non si hanno spiegazioni, una soluzione possibile può consistere nell'adottare valori soglia metododipendenti.

## VALUTAZIONE DEL REATTIVO GLY PRO® PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE GLICATE.

Guerra E., Maritato C., Ferrero C.A., Carobene A., Mapelli E., Ceriotti F.

Laboratorio di Standardizzazione per la Chimica Clinica Diagnostica & Ricerca San Raffaele, IRCCS Ospedale San Raffaele - Milano

**Introduzione:** La determinazione delle proteine glicate, oltre a non risentire di problemi legati alla durata di vita dei GR, consente di monitorare i pazienti diabetici su un intervallo di tempo più breve rispetto alla HbA1c. Fino ad oggi la misura delle proteine glicate o richiedeva metodiche complesse oppure soffriva di notevoli interferenze di carattere aspecifico (fruttosamina). Recentemente è stato introdotto sul mercato un metodo enzimatico GlyPro® (Alifax) che dovrebbe superare molte delle problematiche tipiche della fruttosamina. Scopo del presente lavoro è quello di valutarne le caratteristiche tecniche.

**Materiali e metodi:** Principio del metodo: i frammenti glicati, staccati dalla Proteinasi K, reagiscono con la Ketoaminoossidasi, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sviluppata reagisce con un cromogeno di tipo Trinder. Il metodo è stato applicato su Hitachi 717 (Roche). Le misure di HbA1c sono state eseguite su HA8140 (Menarini).

**Risultati:** Precisione nella serie: 20 replicati di due pool a differente concentrazione di proteine glicate: Pool normale: media = 197,8  $\mu\text{mol/L}$ , CV = 0,49%; Pool elevato: media = 470,9  $\mu\text{mol/L}$ , CV = 0,48%. La precisione tra le serie è stata ottenuta in 10 giorni lavorativi diversi: Pool normale: media = 173,8  $\mu\text{mol/L}$ , CV = 2,41%; Pool elevato: media = 399,1  $\mu\text{mol/L}$ , CV = 0,99%. L'intervallo di riferimento è stato verificato selezionando 90 campioni di donatori (45 femmine e 45 maschi). La differenza tra i due sessi è risultata non significativa e l'intervallo ottenuto (2,5 - 97,5° centile) è uguale a 152 - 230  $\mu\text{mol/L}$ . Sugli stessi campioni sono state misurate le proteine totali, i dati ottenuti però non mostrano alcuna correlazione tra proteine glicate e proteine totali. Sono stati selezionati inoltre 69 pazienti di cui 19 con Insufficienza Renale Cronica. Su tutti i pazienti sono state misurate proteine glicate e HbA1c, su 50 di questi anche la fruttosamina. Le correlazioni sono state le seguenti: Prot. glic. = 1,413 fruttos. - 131,97,  $r=0,9678$ ; Prot. glic. = 73,712 HbA1c - 197,7,  $r=0,8794$ . Linearità: conservata fino a concentrazioni superiori a 2000  $\mu\text{mol/L}$ .

**Conclusioni:** Il reattivo ha una stabilità prolungata, una buona precisione ed un ampio intervallo di linearità. L'intervallo di riferimento ottenuto è in buon accordo con quanto definito dal produttore (122 - 236  $\mu\text{mol/L}$ ). L'intercetta negativa ottenuta nella correlazione con la fruttosamina è probabilmente indice di una maggiore specificità di questo test. La correlazione relativamente scarsa rispetto ad HbA1c è spiegabile con la differente specificità del test.

**Bibliografia:** O'Brien J.E., Brookes M. Diabetes Technology & Therapeutics. 1999;1:447-455.

## EVALUATION OF THE ABBOTT AxSYM TOTAL HOMOCYSTEINE ASSAY

Novembrino C.<sup>o</sup>, Lonati S.<sup>o</sup>, Accinni R.\*, Ippolito S.<sup>o</sup>, Campolo J.\*, Della Noce C.\*, Galli C.<sup>^</sup>, Troonen H.<sup>o</sup>, Rosina M.<sup>o</sup>, Bamonti F.<sup>o</sup>

<sup>o</sup>Dpt Scienze Mediche, Università degli Studi Ospedale Maggiore IRCCS, Via F. Sforza 35, 20122-Milano; \*CNR Ist Fisiologia Clinica, Ospedale Niguarda, Milano; <sup>^</sup>Scientific Affairs, Abbott, Roma; <sup>o</sup>Scientific Affairs, Abbott, Wiesbaden

The interest in plasma homocysteine (Hcy) determination as a strong and independent risk factor for cardiovascular disease is growing up, but the available assays do not allow a throughput suitable for medium or high routines. A new commercially available total Hcy assay on the AxSYM system has been recently proposed. It is a rapid and fully automated fluorescence polarization immunoassay not requiring manual pre-treatment steps.

**Aims** To test the analytical performance of AxSYM Homocysteine method and to compare the results with the HPLC and IMx methods.

**Materials and Methods** Fasting plasma samples were obtained by venipuncture from 166 subjects according to the consensus pre-analytical rules. Hcy concentration was measured by AxSYM and IMx Hcy FPIA methods and by a rapid isocratic HPLC method with fluorescence detection.

**Results** The rs statistic of Spearman correlation were respectively: AxSYM vs HPLC 0.83 (p<0.0001), AxSYM vs IMx 0.97 (p<0.0001) and IMx vs HPLC 0.83 (p<0.0001). The Passing and Bablok method comparison (intercept/slope) showed: AxSYM vs HPLC 2.944/0.937, AxSYM vs IMx -0.367/1.142 and IMx vs HPLC 2.632/0.805. Assay imprecision was ≤ 5% CV, recovery ranged between 99 and 107 %, the analytical sensitivity was 0.28±0.114 μmol/L and the linearity was good up to 1:8 dilution.

The AxSYM Homocysteine method showed a good analytical performance, a satisfactory correlation with HPLC and an excellent correlation with the other FPIA method on IMx. The median difference between AxSYM or IMx and HPLC were +17% and +13%, respectively, whereas the median difference between AxSYM and IMx was zero.

**Conclusion** These results suggest that the new assay is suitable for routine use. The ease of use, complete automation and random accessing of the AxSYM system are time-saving features that will allow many laboratories to include Hcy measurement in the screening procedures to assess the thrombotic risk of healthy subjects and patients.

R. Accinni et al. J Chromatogr A 1998, 828:397-400

## GLYCOHEMOGLOBIN MEASUREMENT (HbA1c) BY TURBIDIMETRIC IMMUNOINHIBITION

Melica T., Grianti C., Romani M., Rinaldi G.

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche Microbiologiche, Azienda Ospedaliera "Ospedale San Salvatore", Pesaro

### INTRODUCTION

HbA1c reflects the mean daily blood glucose concentration over the preceding two months and it is normally used to monitoring the efficiency of dietary control and therapy during treatment of diabetes mellitus. The aim of the study is the evaluation of the Beckman Coulter (Brea, CA.) method in conjunction with Synchron LX System, for the determination of HbA1c as a percentage of total hemoglobin and the correlation with HPLC method (Variant, BioRad-Hercules, CA).

### MATERIALS AND METHODS

This turbidimetric immunoinhibition method needs blood anticoagulated with EDTA and hemolysed.

We evaluated:

- accuracy (repeating 10 times available commercial control material);
- intra-assay precision (repeating 10 times 3 different sample);
- inter-assay precision and hemolysate stability (repeating for 5 days on the same 3 samples);
- linearity of the dilution and analytical sensibility (dilution with Hemolyzing Reagent of a known sample).

### RESULTS

100 healthy subjects showed a range of HbA1c: 3,7÷6,1%. Accuracy: Mean: 6,0; Nominal: 5,8; %nominal: 103. Intra-assay precision:

Normal level: Mean 5,5; SD 0,09; CV% 1,65;

Border-line level: Mean 6,1; SD 0,14; CV% 2,22;

Abnormal level: Mean 9,8; SD 0,26; CV% 2,63.

Inter-assay precision:

Normal level: Mean 5,7; SD 0,23; CV% 3,94;

Border-line level: Mean 6,3; SD 0,07; CV% 1,17;

Abnormal level: Mean 10,1; DS 0,11; CV% 1,06.

After 4 days at 4°C or after 1 day at 20°C, the result variation has been over 3 SD.

HbA1c linearity:  $y=1,0054x-0,074$ ;  $r=0,9966$

Hb linearity:  $y=0,9740x+0,463$ ;  $r=0,9988$ ;

Sensibility for HbA1c: 0,3g/dl; for Hb: 6g/dl.

Correlation:  $y=0,9922x-0,127$   $r=0,9926$ .

### CONCLUSION

The hemolyzated sample is stable for 4 days at 2-8°C and 1 day at room temperature.

Our results show that this method is useful for the routine determination of HbA1c.