

Ohrvik A., Lindh M., Mack M.

DEVELOPMENT OF A FULLY AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE ASSAY FOR THE DETERMINATION OF CYTOKERATIN 19

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

Serum TPA and CYFRA 21-1 are well-established markers for tumours arising from epithelial cells. CYFRA 21-1 measures the total Cytokeratin 19 level (CK 19), while TPA measures CK 8, 18 and 19 levels. TPA levels have been shown to correlate with the extent of disease and are a valuable parameter for the monitoring and follow-up of carcinomas of the lung, breast, colorectum or urinary bladder. CYFRA 21-1 is a valuable parameter for monitoring and follow-up especially in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Twenty different CKs have been found in epithelial cells. In vivo complexes between a type I CK (CK 9-20) and a type II CK (CK 1-8) are always formed. In the internal epithelial cells the most predominant CK complexes are CK 8/18 and CK 8/19.

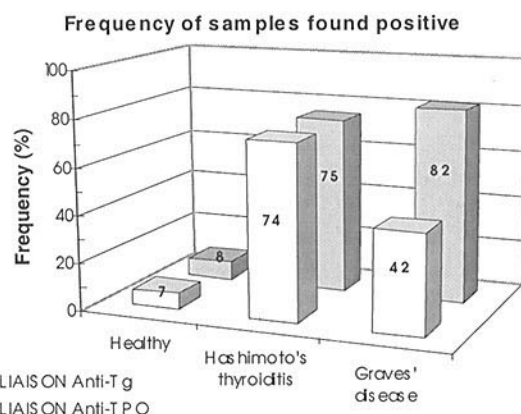
The objective of this study was to develop an assay for the measurement of CK 8/19 fragments released into serum and to evaluate the performance of the analytical method. An immunoassay utilising chemiluminescence and paramagnetic particles has been developed for the fully automated random access LIAISON® immunoanalyser. The LIAISON CK 19 assay is a two-site immunoluminometric one-step assay using two specific monoclonal antibodies. The solid phase mab recognises a discontinuous epitope corresponding to amino acids 348-377 on human CK 8 while the detector antibody reacts with the 2B region on CK 19. The total incubation time is only 10 min. A specifically designed Reagent Integral contains all specific reagents, except calibrators. The on board stability of these reagents is >2 weeks. The assay works with a 2-point calibrated master curve. Primary standardisation was performed against soluble CK 19 content. 50 µl of sample is added to 200 µl of tracer and 20 µl of antibody-coated magnetic particles. After 10 min incubation the particles are separated, washed and the chemiluminescent signal is generated. Time to first result is only 15 min. The assay with a measuring range from 0.05 – 150 ng/ml shows no high-dose hook effect up to 1,000 ng/ml (spiked sera). Linearity upon dilution and recovery, in the measuring range, is within ± 20% from the theoretical value. Within-run imprecision is <5% CV and between-run imprecision is <3% (calculated as variance components). Twelve patients followed up for NSCLC (4-25 months) were also tested with the CK 19 assay and CYFRA 21-1 Elecsys (Roche Diagnostics). Of the 12 cases, 8 males and 4 females aged between 37 and 72 years, 4 suffered from squamous cell carcinoma, 4 from large cell carcinoma and 4 from adenocarcinoma. The marker profiles were almost identical for the two assays as could be expected from the correlation between them (simple linear regression, n=80, r=0.97). In summary, the method offers a rapid and accurate determination of CK 8/19 fragments in sera.

Bach M., Bidlingmaier M., Hörmann R., Mack M.

RESULTS FROM EXTERNAL EVALUATION OF LIAISON® ANTI-TPO AND ANTI-TG ASSAYS ON THE FULLY AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE LIAISON® IMMUNOASSAY ANALYSER.

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

The LIAISON® Anti-TPO and Anti-Tg assays were evaluated by two laboratories. Precision studies were performed with three pool sera with analyte concentrations ranging between 30 and 430 IU/ml (Anti-TPO) and between 50 and 770 IU/ml (Anti-Tg). Medians of intra-assay CVs were found ≤ 7.0% (Anti-TPO) and ≤ 5.9 % (Anti-Tg). These results were confirmed by precision profiles based on duplicate determinations of native serum samples. Inter-assay CVs were generally found between 8 and 16% depending on the analyte concentration of the samples. Dilution experiments were performed using native samples and the original kit diluent. Recovery values were typically found between 88 and 116 % (Anti-TPO) and between 90 and 110% (Anti-Tg). Both assays showed comparable results for serum, heparinised plasma and EDTA plasma. A slight trend towards lower values was observed when citrated plasma was used as sample material. Method comparison studies were performed by 4-field analysis on the basis of cut-off indices versus the corresponding Immulite immunoassays (DPC) and the Synelisa immunoassays (Pharmacia&Upjohn). All methods showed similar results with respect to specificity. However, the LIAISON and the Immulite assays revealed a higher sensitivity for the detection of patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than the Synelisa assays. The clinical differentiation of the two LIAISON assays was investigated in a group of 384 subjects (apparently healthy:193, Hashimoto's thyroiditis: 61, Graves' disease: 130):



The LIAISON system offers good practicability and clinically adequate performance characteristics for the thyroid autoimmune assays tested.

G037

Hirschberg L., D'Amico Y., Pisa E.K., Mack M.

LIAISON® SANGTEC®100, A NEW AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF S100B PROTEIN

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

The calcium binding protein S100B is expressed in astroglia cells, as a dimer of the subunit S100B. The family of S100 proteins consists of 19 members, of which S100B is one. The protein is shown to be a marker of brain damage. The clinical value of Sangtec®100 has been demonstrated in stroke, cerebral complications in association with cardiac arrest and in patients with severe as well as minor head injury. Patients with progressive melanoma disease also show elevated serum concentrations of S100B. Sangtec 100 detects S100B, and is now available for the fully automated LIAISON system which is based on paramagnetic particles as solid phase and a tracer antibody labelled with an isoluminol derivative. The assay uses the same antibodies as the reference method LIA-mat® Sangtec100 and is a two-step sandwich assay with a total incubation time of 20 min. Time to first result is about 35 min. Data reduction is done with a master curve after recalibration with two calibrators provided with the Reagent Integral. LIAISON Sangtec 100 covers a concentration range up to 30 µg/l, with a typical within-assay precision below 5%, and a between-assay precision below 10%. The analytical sensitivity is 0.013 µg/l, defined as the intercept of three standard deviations of zero binding from the standard curve. Linearity is normally within ±10% of the theoretical sample value. High-dose hook is not detected up to 2,700 µg/l. The cut-off, evaluated by measuring 201 blood donor samples, was found to be 0.15 µg/l for the 95th percentile. The mean concentration of S100B in this group was 0.087 µg/l. All samples had a concentration greater than 0.02 µg/l.

A method comparison of LIAISON Sangtec100 to the established LIA-mat Sangtec100 demonstrates a correlation coefficient of 0.99 and a slope of 1.04 by linear regression analysis of samples within the assay range, and 0.97 (correlation) and 0.96 (slope) for samples with concentrations below 1 µg/l. LIAISON Sangtec100 offers a rapid, reliable and precise method for the fully automated determination of S100B and correlates well with LIA-mat Sangtec100.

G038

Bach M., Jung K., Ivankovic B., Löwer Y., Mack M.

LIAISON® fPSA: DEVELOPMENT OF AN ALTERNATIVE METHOD FOR THE DETERMINATION OF FREE PSA ON THE FULLY AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE LIAISON® IMMUNOASSAY ANALYSER

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

LIAISON® fPSA is a rapid, fully automated immunoassay designed to be run on the LIAISON immunoassay analyser. The LIAISON fPSA assay is a modification of the already established LIAISON PSA assay, a two-step, two-site immunoluminometric assay using two highly specific monoclonal antibodies. The combination of these antibodies allows the equimolar detection of free PSA and the PSA-ACT complex. To allow the detection of free PSA, a specific antibody has been added to the reagents (ACT-PR reagent, Scantibodies Laboratory, Santee, USA) which precipitates the PSA linked to ACT. Thus, only non-ACT bound PSA participates in the reaction. 50 µl serum sample is incubated with antibody-coated paramagnetic particles (Dynabeads®) and ACT-PR reagent. After a washing-step the isoluminol labelled tracer antibody is added and the final immunocomplex is formed. The chemiluminescent signal is generated by the addition of starter reagents. Sample concentrations are calculated using a stored master curve recalibrated with two calibrators. First results can be obtained after 25 min. Samples with maximum analyte concentrations of 25 ng/ml can be measured without dilution. Within-assay CVs are typically found below 5% using artificial controls with PSA concentrations >0.5 ng/ml. Precision profiles based on duplicate determination of native serum samples (mean free PSA concentration = 1.36 ng/ml) show a mean within-assay CV of 8.2%. 56 serum samples (24 BPH, 32 PCA) were used for comparative measurements with established fPSA/PSA assays (Elecsys, LIAISON). The ROC analysis was performed on the basis of f/t PSA ratios, using samples with a total PSA value between 3 and 10 ng/ml. Areas under the curve were found to be similar for all three methods: LIAISON (ACT-PR technology): 0.876 (SE=0.069), Elecsys: 0.835 (SE=0.080), LIAISON (common version): 0.847 (SE=0.079). In conclusion, the first experiments with the alternative method for the determination of free PSA on the LIAISON immunoassay analyser reveal a good technical performance and an excellent comparability to the established methods tested.

G039

Caldini A., D'Albasio G.*, Amorosi A.°, Rapi S., Montenora I., Tarantino O.*, Nesi G.°, Bagnoli S.*, Messeri G.

IDENTIFICATION OF HIGH RISK PATIENTS IN ULCERATIVE COLITIS BY MEANS OF DNA ANEUPLOIDY AND HISTOLOGICAL DYSPLASIA

Laboratorio Analisi Biochimico Cliniche and (*) U.O. Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera Careggi; (°) Istituto di Anatomia Patologica, Università di Firenze, Firenze.

The risk of colorectal cancer among patients with long standing ulcerative colitis (UC) is high. Despite the effort to perform screening programs by identification of histological dysplasia, diagnosis is often delayed with negative consequences on prognosis. Therefore the identification of patients' subset at higher risk represents a crucial point. Sixty patients affected by extensive UC from at least 15 years were selected for a prospective surveillance program. Each patient underwent a total colonoscopy with multiple biopsies. Biopsy specimens were sampled at regular intervals in the colon and rectum and from macroscopic lesions when present. Specimens were assessed for dysplasia by the same expert pathologist and for DNA aneuploidy by Flow Cytometry (FC) in a double blinded manner. For DNA Index analysis fresh/frozen samples were stained, after mechanical disaggregation, with a standard Propidium Iodide/RNase staining technique and at least 20000 nuclei analyzed using Multicycle 2.53 (Phoenix). Histograms with a diploid CV >5.0% and/or BAD >20% were discarded from the study. During endoscopy, 40 out of 60 patients showed macroscopic lesions (polipoid mass and/or lumen narrowing). Eleven patients out of 40 with macroscopic lesions revealed at least one aneuploid biopsy by FC (27.5%) and among them 5 were found negative for dysplasia, 1 low grade and 2 indefinite, whereas the last 3 patients resulted affected by colorectal cancer. No patient showed dysplasia without aneuploidy. Our results confirm the close correlation between aneuploidy and dysplasia. Moreover, during cancer progression, DNA Index alteration seems to be an earlier phenomenon than dysplasia. For these reasons FC could represent an interesting selection technique into a colonoscopy surveillance program for high risk long standing UC patients, possibly reducing costs and improving effectiveness of the surveillance program itself.

Lindberg JO et al. DNA aneuploidy as a marker of premalignancy in surveillance of patients with ulcerative colitis. *Br J Surg* 1999, 86(7):947-50.

G040

Napolitano R., Caliendo I., Marcacci G., Volpe A., Sementa A., Santulli B., Volpe E.

DETECTION OF NUMERICAL AND STRUCTURAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN MONOCLONAL GAMMAPATHIES USING FISH ANALYSIS

A.O. S.Giuseppe Moscati di Avellino, Servizio di Ematologia e UTIE

The identification of cytogenetic abnormalities has gained considerable importance in the understanding of leukemia as shown by the prognostic impact of specific chromosomal changes. The low proliferative rate of the malignant plasmacells has hampered similar progress in Multiple Myeloma (MM). This limitation can be overcome using fluorescent interphase cytogenetic analysis (FISH). We obtained bone marrow sample from 10 normal controls and 35 from patients with monoclonal gammopathies. Fish was performed on cytogenetic pellet samples using centromeric probes specific to CHRs 3,5 7, 8, 9,15, to detect gains or losses of these chromosomes and using region specific DNA probes: for 13q14, 17p13, 11q23, 14q32.3 (D14S308). Quantitative changes were detected not only in stage III disease, but also in stage I suggesting that most numeric changes occur during asymptomatic phase of gammopathies. So far MGUS and MM seem to share common features, namely chromosomal instability and loss of control of chromosome number. Otherwise none of specific structural abnormalities have been detected for MGUS patients. Our results agree a multistep process that after other chromosomal changes leads to MM. Specific chromosomal aberrations, particularly deletion of 13q, were linked with prognosis in previous karyotypic studies of MM, but conventional cytogenetic underestimates the true incidence of these abnormalities, considered important for risk adapted stratification, in MM. The prognostic value of FISH analysis will be presented.

Pagani F., Panteghini M.

BIOLOGICAL VARIATION IN SERUM CONCENTRATIONS OF C-TELOPEPTIDE OF TYPE I COLLAGEN (s- β CTX)

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia, Italy

Roche Diagnostics recently developed on Elecsys® analyzer the β -CrossLaps™ assay for measurement of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptide in serum, using two specific monoclonal antibodies against the amino acid sequence of Glu-Lys-Ala-His- β Asp-Gly-Gly-Arg derived from the C-terminal region of α_1 chain, where the aspartic acid residue is β -isomerized (s- β CTX). Information on the biological variation of s- β CTX is however not available, a fact that is limiting since it is well known that the clinical utility of bone markers can be affected by their physiological variation. Here we assessed the analytical and biological components of variation of s- β CTX. Ten healthy volunteers (5 men and 5 premenopausal women) aged 25-50 years took part in this study over a one-month period. After fasting for 12 h, venous blood samples were collected on the same day once a week for 4 weeks and serum was stored at -25°C until analysis. When all the specimens were available, they were assayed in a single run in duplicate in random order to minimize any bias due to the effect of analytical drift. Analytical (CV_A), within-subject (CV_I), and between-subject (CV_G) components of variation were calculated by nested ANOVA from replicate analyses. We also calculated the critical difference (CD) for significant changes in serial results ($P \leq 0.05$), the index of individuality (II), and the number of specimens required to ensure that the mean result is within $\pm 10\%$ of the individual's homeostatic setpoint of the marker. Most of the observed variability of s- β CTX was biologic (CV_A , 7.8%; CV_I , 16.7%; CV_G , 40.3%). From the average CV_I , the desirable goal for analytical imprecision ($CV_A \leq 0.5CV_I$) is $\leq 8.4\%$. Thus, in this limited assessment, the intra-batch imprecision of the Elecsys β -CrossLaps met this goal. The marked individuality (II=0.41) showed a general poor ability of s- β CTX to separate "abnormal" from "normal" population values, making the use of conventionally calculated reference limits inadequate for interpretation of s- β CTX values. The applicable difference (CD) required for two results to be significantly different was 51%. 13 samples are theoretically required to estimate, $P \leq 0.05$, an individual's s- β CTX value to within 10% of the true mean value. Our results demonstrate that, due to its high biological variation, s- β CTX may be an useful adjunct in monitoring bone resorption only when CD and subject-specific rather than population-based reference intervals are the statistical guidelines for clinical decisions.

Bairati C.^a, Goi G.^a, Massaccesi L.^a, Notti P.^b, Lombardo A.^a

EFFETTO PROTETTIVO DEL SELENIO SU LINFOCITI UMANI COLTIVATI IN PRESENZA DI ARSENICO E ANTIMONIO.

^aDipartimento di Chimica e Biochimica Medica, Università degli Studi di Milano. ^bServizio Trasfusionale dell'Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

E' noto che il selenio (Se) agisce come agente protettivo stimolando i meccanismi antiossidanti cellulari e aumentando quindi l'immunità durante le infezioni microbiche e la carcinogenesi (1). Più recenti sono le osservazioni che indicano come il Se sia anche coinvolto nella detossificazione dell'organismo da metalli e da alcuni agenti xenobiotici.

In questa ricerca abbiamo studiato la tossicità dell'arsenico trivalente (As) e dell'antimonio trivalente (Sb), due note sostanze impiegate in molteplici applicazioni industriali, utilizzando come modello la secrezione di enzimi lisosomali da parte di linfociti umani coltivati e abbiamo studiato l'effetto protettivo di vari composti del Se (SeO_2 , Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 e la selenometionina) su tale secrezione.

La valutazione della secrezione di enzimi lisosomali dai linfociti in coltura è stata studiata secondo il metodo di C. Bairati et al. Sono state studiate la N-acetil- β -D-glucosaminidasi e la β -D-glucuronidasi, le cui attività sono state determinate con metodo fluorimetrico utilizzando i 4-MU derivati come substrati. L'As induce nei linfociti una diminuzione, statisticamente significativa, della secrezione a partire dalla dose di 200 $\mu g/L$, fino a 400 $\mu g/L$. Solo due dei composti del Se considerati (SeO_2 e Na_2SeO_3) hanno neutralizzato totalmente l'effetto dell'As. La concentrazione minima di Se risultata efficace ad esercitare un effetto protettivo è stata di 600 $\mu g/L$ relativamente a una concentrazione di 400 $\mu g/L$ di As. L'Sb induce nei linfociti in coltura un aumento, statisticamente significativo, della secrezione a partire dalla dose di 200 $\mu g/L$ e fino a 300 $\mu g/L$. Nel caso dell'antimonio, solo l' SeO_2 alla concentrazione di 400 $\mu g/L$, ha neutralizzato totalmente l'aumento della secrezione provocato da 300 $\mu g/L$ di Sb. L'effetto del Se è comunque risultato in tutti i casi dose dipendente. La vitalità delle cellule variava dal 98% al 95% ed è stata controllata con il test ad esclusione del Trypan-Blue. La sofferenza cellulare è stata valutata con il dosaggio della lattico deidrogenasi.

Il modello di studio da noi utilizzato è risultato essere molto sensibile alla misurazione della tossicità di vari elementi e conferma i dati in letteratura sull'azione protettiva esercitata dal selenio nei confronti dell'arsenico e dell'antimonio.

(1) Schrauzer GN. "Selenium. Mechanistic aspects of anticarcinogenic action" Biological Trace Element Research. 33, 51-62 (1992)

G043

Errigo A.#, Carru C.#, Pes M.#, Deiana L.#, Franceschi C.*, Baggio G.§

BONE METABOLISM PARAMETERS IN OLDEST-OLD SUBJECTS: PRELIMINARY FINDINGS IN THE SARDINIAN CENTENARIAN STUDY

#Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari, *Dip. Patologia Sperimentale, Università di Bologna, §Medicina Generale, Azienda Ospedale-Università di Padova

Centenarians are exceptional individuals characterized by a delayed aging process and capable to reach the extreme end of human life span. In these subjects the bone tissue metabolism is different from that of younger people, but information is still incomplete as well as the incidence of osteoporosis and bone fractures. During the AKEA Sardinian Centenarian Study (SCS), a population-based study of all persons ≥ 100 yrs of age, born and resident in Sardinia, we measured the serum level of calcium, phosphate and alkaline phosphatase (ALP) in 124 centenarians (84 F, 40 M), 26 centenarians siblings (15 F, 11 M, mean age), as well as in 143 sex-matched healthy controls of 60 ± 1 yrs of age. No subjects had impaired liver function, as defined by AST, ALT or GGT above the normal range. Moreover, we evaluated the frequency of bone fractures within the last year in the three groups. Mean serum calcium (mg/dL), after correction for albumin, did not show any significant difference among the three groups (9.2 ± 0.8 in centenarians, 9.5 ± 1.0 in siblings and 9.2 ± 0.6 in sexagenarian controls) and no gender-related differences were observed. Similar results were obtained for serum phosphate (3.5 ± 0.6 mg/dL, 3.4 ± 0.6 mg/dL, and 3.3 ± 0.5 mg/dL in centenarians, siblings and controls, respectively). Mean levels of total serum ALP were significantly increased in centenarians (109.1 ± 64.6 U/L) in comparison to controls (78.6 ± 20.8 U/L, $P < 0.0005$) although centenarian men had ALP levels 14% lower than women. This sex dependent increase was also observed in siblings though not significantly. Twenty centenarians (17 F, 3 M) had had bone fractures, 6 fractures (5 F, 1 M) were detected in controls. Thus, the frequency of fractures among Sardinian centenarians (16%) seems to be lower in comparison to that reported in an Italian series (37%; Passeri G. et al., 2000). These preliminary and incomplete findings may suggest that changes in bone metabolism are found in extreme old age but centenarians seems to be highly resistant to develop severe osteopenia and bone fractures. The genetic or environmental factors that account for these exceptional resistance are therefore to be further investigated.

G044

Magni F.^a, Pereira S.^a, Ferrarese C.^b, Galli Kienle M.^c

IDENTIFICAZIONE DEGLI ADDOTTI TRA PEPTIDI β -AMILOIDE E UNO DEI PRODOTTI FINALI DELLA LIPIDOPEROSSIDAZIONE (HNE) MEDIANTE ESI-MS.

^aIRCCS San Raffaele, ^bDipart. di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche, ^cDipart. di Medicina Sperimentale, Ambientale e Biotecnologie Mediche, Univ. degli Studi di Milano-Bicocca, Milano.

Ricerche recenti indicano che l'aldeide 4-idrossi-2-nonenale (HNE) induce un aumento della vulnerabilità ed eccitotossicità neuronale. La lipidoperossidazione, di cui HNE rappresenterebbe uno dei prodotti finali, è considerato un evento precoce nella patogenesi dell'Alzheimer e sarebbe indotto dal peptide(i) β -amiloide (A β). Infatti, è stato dimostrato che agenti antiossidanti proteggono le cellule dai processi degenerativi originati da A β mentre HNE aumenta il danno. La presenza di prodotti della lipidoperossidazione in placche di pazienti AD è stata determinata utilizzando un anticorpo anti-HNE-proteine e si è evidenziata una reattività positiva nelle aree perivascolari con depositi di amiloide. È noto che le aldeidi che derivano dalla lipidoperossidazione si legano alle proteine dando luogo a basi di Schiff con gruppi nucleofili dei residui aminoacidici. Inoltre a causa del doppio legame coniugato al carbonile, HNE dà luogo ad una addizione di Michael con i residui di cisteina, lisina e istidina della catena peptidica. Per poter meglio definire l'attività biologica di questi prodotti si sono studiate le condizioni di formazione di addotti HNE:A β con diversi rapporti molari aldeide / peptide per diversi tempi di reazione utilizzando i peptidi maggiormente presenti nelle placche senili (A β 1-28, A β 1-40, A β 1-42). La caratterizzazione diretta degli addotti formati durante la reazione è stata ottenuta mediante ESI-MS dopo desalificazione del campione. Gli spettri ESI-MS dei peptidi dopo reazione presentano ioni multicarica a $m/z + n31$ rispetto agli spettri dei peptidi puri. Ciò indica la formazione di specie con più di un residuo aldeidico nella catena peptidica. Per tutti i peptidi studiati si è osservata l'incorporazione fino a 5 molecole di aldeide addizionate con la reazione di Michael nella condizione di reazione con massimo rapporto molare. I peptidi β -amiloidi considerati contengono sei aminoacidi in grado di legarsi con HNE: l'aminoacido N-terminale, due lisine e tre istidine. L'identificazione dei siti di reazione è stata ottenuta mediante digestione enzimatica con tripsina ed analisi in micro HPLC-ESI dei peptidi prima e dopo trattamento con HNE. I dati ottenuti indicano che la formazione di addotti secondo Michael avviene essenzialmente sui residui di istidina. L'analisi dell'accessibilità della superficie al solvente non sembra evidenziare differenze tra i vari aminoacidi escludendo perciò che la diversa reattività sia legata ad una diversa accessibilità all'HNE dei vari siti.

G045

Paterna L., Pozzi F., Alessio M.G., Spagnolo A., Petrini C.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ DI TRE SISTEMI ELETTROFORETICI NELL'INDIVIDUAZIONE DELLE COMPONENTI MONOCLONALI DEL SIERO

Laboratorio di Chimica Clinica e di Ematologia, Azienda Ospedaliera "Ospedale S. Carlo B.", Via Pio II, 3 - 20153 Milano.

Scopo della nostra ricerca è stato quello di valutare l'efficienza e la sensibilità di tre sistemi elettroforetici nell'individuazione delle Componenti Monoclonali (CM) scegliendo come sistema di riferimento l'immunofissazione (IFE) che è stata eseguita su tutti i campioni. I tre sistemi elettroforetici presi in considerazione sono stati: elettroforesi manuale su acetato di cellulosa, elettroforesi su gel d'agarosio con strumento Hydrasys (ditta Sebia), elettroforesi capillare con strumento Paragon CZE (ditta Beckman). Sono stati esaminati 955 campioni che sono stati divisi in due gruppi poiché con l'elettroforesi in agarosio per 690 campioni è stato utilizzato il normale programma di migrazione per le proteine del siero, mentre per i rimanenti 255 è stato utilizzato il programma ad alta risoluzione. Tutti i campioni processati con i tre sistemi elettroforetici sono stati esaminati visivamente per la ricerca delle anomalie presumibilmente causate dalla presenza di CM e come tali da sottoporre a IFE. Nel primo gruppo all'IFE sono state trovate 131 CM (19%) e nel secondo gruppo 45 (17.6%). I risultati sono specificati nella Tabella 1.

TABELLA 1

1° Gruppo (690c)		2° Gruppo (255c)		
Metodo	Anomalie	CM confermate	Anomalie	CM confermate
El. Man.	118 (17%)	56 (8%)	50 (19,6%)	19 (7,4%)
El. Capill.	123 (17,8%)	55 (8%)	42 (16,5%)	26 (10,2%)
Gel Agar	176 (25,5%)	73 (10,5%)	87 (34%)	32 (12,5%)

Abbiamo calcolato poi la sensibilità, la specificità e l'efficienza di ciascun metodo (Tabella 2)

TABELLA 2

	Sensibilità	Specificità	Efficienza
1° GRUPPO			
El. Manuale	42,7%	89%	80%
El. Capillare	42%	88%	79%
Gel Agarosio	55,7%	81,5%	76,6%
2° GRUPPO			
El. Manuale	42,2%	85,2%	77,6%
El. Capillare	57,7%	92,4%	86,3%
Gel Agarosio	71%	73,8%	73,3%

G046

De Luca C., Bosoni T., Bruno R., Cerutti L., Pirolini L., Villani C.

CINETICA DELLA PROTEINA C REATTIVA E DELLA PROTEINA SIERO AMILOIDE A NELL'INFARTO MIOCARDICO ACUTO

Servizio Analisi Chimico-Cliniche, I.R.C.C.S. Policlinico S. Matteo, Pavia

La proteina sieroamiloide A (SAA) è una proteina multifunzionale coinvolta nella modulazione di numerose risposte immunitarie durante i processi infiammatori e nella risposta di fase acuta. Infezioni batteriche e virali provocano un improvviso aumento della sintesi della SAA e la sua concentrazione diminuisce rapidamente al regredire dell'infezione. La determinazione in parallelo di PCR e SAA può aumentare la sensibilità ottenuta per le proteine di fase acuta nella diagnosi delle infezioni.

Scopo del nostro studio è valutare la cinetica temporale di SAA e PCR nell'infarto del miocardio dal momento del ricovero del paziente fino alla risoluzione dell'episodio acuto e di verificare se esiste una correlazione statistica tra le due proteine.

L'indagine è stata condotta su 11 pazienti (7 uomini e 4 donne) ricoverati presso il reparto di Unità Coronarica con diagnosi di infarto miocardico acuto. Campioni di sangue intero sono stati prelevati al momento del ricovero (t0) e ad intervalli di 6,12,24,48,72,96 ore, e su tutti sono state dosate PCR e SAA con metodo nefelometrico amplificato al lattice su nefelometro BNII (DADE Behring SPA).

La PCR (v.n.<0.5) comincia ad aumentare significativamente dopo 12-24 ore dal ricovero ed il suo valore raggiunge la massima concentrazione intorno a 48-72 ore (x medio=9.07). La SAA (v.n.<0,6) da' una risposta importante già dopo 6 ore dall'ospedalizzazione (x medio=1.06) ed il suo valore risulta aumentato di una volta e mezza dopo 12 ore. Il picco di massima concentrazione è raggiunto anche in questo caso intorno alle 48-72 ore, dove il valore ritrovato è di circa 16 volte il normale. I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente secondo il metodo di Matthews, Altman, Campbell e Royston che ha permesso di trasformare i dati relativi alle misurazioni delle due proteine, sotto forma di aree confrontabili statisticamente (AREA PCR=96,78±0,12 AREA SAA) con un valore significativo di p=0.029 e buona correlazione r=0.66. PCR e SAA hanno cinetiche e tempi di risposta differenti rispetto ai comuni markers usati per la diagnosi di infarto miocardico suggerendone un possibile utilizzo per il monitoraggio del processo necrotico conseguente.

G047

Bonetti G.¹, Stefani F.¹, Pagani F.¹, Cuccia C.², Panteghini M.¹

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DECISIONALI PER LA TROPONINA I CARDIACA SU SISTEMA BAYER ACS:180

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1 e ²Divisione di Cardiologia, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

Scopi della ricerca. I pazienti con danno miocardico 'minimo' (MMD), individuati con il dosaggio delle troponine cardiache, hanno un elevato rischio di andare incontro ad eventi cardiaci maggiori. E' importante, tuttavia, non classificare tali soggetti come pazienti con infarto miocardico acuto (IMA), a causa dei problemi di natura sociale, psicologica ed economica che ne conseguirebbero. Per l'impiego ottimale del dosaggio delle troponine sono quindi necessari due cutoff decisionali: uno più basso che individui la presenza di MMD ed un secondo più elevato che suggerisca la diagnosi di IMA secondo i classici criteri OMS. Questo studio ha definito tali cutoff relativamente alla determinazione della troponina I cardiaca (cTnI) su analizzatore Bayer ACS:180, utilizzando l'approccio recentemente raccomandato dal Gruppo di Studio ANMCO-SIBioC-SIMeL 'Marcatori di lesione miocardica' (Biochim Clin 1998;22:516).

Metodi. Cutoff MMD: 120 soggetti apparentemente sani sono stati selezionati usando i criteri standard per lo studio dei valori di riferimento. Il 97.5° percentile della distribuzione dei valori di cTnI in questo gruppo identificava il cutoff per MMD. Cutoff IMA: la popolazione studiata era costituita da 60 soggetti con IMA, confermato mediante i criteri OMS, e da 60 soggetti con sindrome coronarica acuta (ACS) ma senza IMA-OMS. La cTnI era determinata in un campione di sangue ottenuto all'interno della finestra diagnostica ottimale per tale marcatore (12-72 ore dall'insorgenza dei sintomi per i pazienti con IMA e 12-24 ore dall'insorgenza per i pazienti con ACS). Per stabilire il cutoff per IMA era impiegata l'analisi della curva operativa caratteristica (ROC).

Risultati e conclusioni. Tutti i risultati nei soggetti sani erano inferiori al limite di rivelabilità del metodo (cTnI indosabile). Il cutoff per MMD per la cTnI ACS corrisponde quindi alla minima concentrazione rilevabile del test, cioè 0.2 µg/L. Il cutoff per IMA era 3.1 µg/L. Utilizzando questo cutoff, si ottenevano una sensibilità del 95.0% (95% intervallo di confidenza: 86-99%) ed una specificità di 96.7% (88.4-99.5%) nella capacità della cTnI ACS di diagnosticare un IMA se determinata all'interno della sua finestra diagnostica ottimale. L'area sottesa alla curva ROC (0.991±0.009) confermava l'elevata accuratezza diagnostica di questo test.

G048

Floreni M.¹, Casadei A.², Fanolla A.³, Cosio G.¹, Marchesi M.²

NEFROPATIA DIABETICA E PROTEINURIA TUBULARE: RUOLO DEL DOSAGGIO DELL'ALFA1-MICROGLOBULINA NEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2

¹Laboratorio Biochimica Clinica, Ospedale Bolzano

²Reparto Medicina Prima, Ospedale Bolzano

³Osservatorio Epidemiologico, Provincia Bolzano

Negli ultimi anni sono notevolmente aumentati i pazienti con diabete mellito di tipo 2 che hanno sviluppato una insufficienza renale terminale.

Attualmente la nefropatia diabetica viene classificata in base alle indicazioni internazionali vigenti (Morgensen C.), con la divisione dei pazienti in quattro gruppi in relazione ad albuminuria e creatinemia.

Obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare, con il dosaggio dell'alfa1-microglobulina (A1-M), l'importanza della componente tubulare nei diversi stadi della nefropatia diabetica. Numerosi autori indicano che le proteine a basso peso molecolare sono aumentate nell'urina dei pazienti diabetici rispetto ai controlli, e che il danno tubulare può precedere quello glomerulare anche di 5 anni.

Il nostro studio è stato condotto su una popolazione di 160 pazienti diabetici non insulino-dipendenti, età media 61.7±7.0, durata media del diabete 10.9±7.7, e 53 pazienti di controllo. Tale studio ha confermato la presenza di differenze significative di A1-M non solo tra gruppo di controllo e pazienti diabetici ma anche tra i pazienti dei quattro gruppi nei quali è stata divisa la popolazione diabetica (t di Student; p<0.01), evidenziando che la concentrazione media di A1-M aumenta col progredire della nefropatia.

Con la regressione multipla abbiamo stimato la variabile dipendente A1-M in funzione delle variabili indipendenti albumina, cistatina C, età, età diabete, glicemia, HbA1C ottenendo l'equazione della retta $y = -6.2 + 0.01x + 17z$ (x=albumina, z=cistatina C; R-quadrato=0.54). La correlazione tra A1-M e albuminuria è significativa (r=0.67) se si considera tutta la popolazione diabetica, mentre la significatività è bassa (r=0.31) nel gruppo di pazienti con microalbuminuria; inoltre la proteinuria tubulare può essere presente anche nei pazienti con albuminuria inferiore a 30 mg/24h. Ciò suggerisce che nel paziente diabetico nefropatico l'A1-M non è correlata in modo significativo con età, età diabete, controllo metabolico e, nei primi stadi della nefropatia, neppure con albuminuria.

In conclusione i nostri risultati indicano come l'A1-M possa risultare un marker utile per selezionare i pazienti da sottoporre ad un più stretto controllo clinico, soprattutto negli stadi iniziali della nefropatia diabetica.

G049

Colella F.¹, Dalla Dea L.², Righetti G.¹, Blessum C.², Graziani M.S.¹

VALUTAZIONE DI UN TAMPONE DI NUOVA FORMULAZIONE PER ELETTROFORESI CAPILLARE

¹Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera di Verona; ² Beckman-Coulter Milano-Brea (CA) USA.

La tecnica capillare per l'esecuzione della elettroforesi proteica è stata introdotta nel laboratorio clinico da qualche anno ed ha portato indubbi vantaggi migliorando la precisione e l'accuratezza di questo test. E' noto tuttavia che nessun sistema analitico (supportato o capillare) è in grado di rilevare qualsiasi componente monoclonale (CM), essendo ognuna di queste una proteina peculiare con ben definite caratteristiche fisico-chimiche. L'elettroforesi capillare eseguita su Paragon@CZE2000 (Beckman-Coulter) manca il riconoscimento di alcune CM, specialmente IgM, con proprietà particolari (es. legame con lipoproteine). Si è perciò resa necessaria la riformulazione del tampone di corsa al fine di superare questo problema, di fondamentale importanza se si considera che uno dei principali motivi per la richiesta di elettroforesi proteica è la ricerca di CM. La valutazione del nuovo tampone ha riguardato l'affidabilità del reagente per: precisione, resistenza agli interferenti, abilità nel riconoscimento di CM, qualità della risoluzione del tracciato. La precisione è rimasta inalterata rispetto al tampone già in uso (media, CV%): albumina 57, 1.0; alfa-1=7.0, 2.9; alfa-2=12.1, 1.8; beta=11.8, 3.2; gamma=12.1, 3.2. Anche la sensibilità agli interferenti non si è modificata, non evidenziandosi alterazioni del tracciato fino a 0.5 g/L di emoglobina, e 500 µmol/L di bilirubina. Il nuovo tampone è stato in grado di svelare 12 CM che non si erano evidenziate con il tampone precedentemente in uso e di tipizzarle correttamente mediante immunosottrazione (metodo di confronto immunofissazione in gel di agarosio). La risoluzione del tracciato presenta, rispetto al tampone in uso, le seguenti differenze: 1. in zona alfa-1, la alfa-1-glicoproteina acida risulta poco evidente in quanto migra troppo vicina alla alfa-antitripsina, 2. in zona alfa-2 — beta viene evidenziata la betalipoproteina, 3. in zona beta — gamma viene evidenziato il fibrinogeno (qualora venga fatto migrare plasma). Il tampone di nuova formulazione è in grado di superare il problema del mancato riconoscimento di alcune CM che il tampone precedente presentava; tali CM vengono poi correttamente tipizzate mediante immunosottrazione. La comparsa della betalipoproteina comporta la necessità di ridefinire i range di riferimento per la zona alfa-2 o beta, a seconda se essa viene calcolata con la prima o con la seconda. La migrazione di più proteine nella stessa zona elettroforetica pone ancora una volta il problema della refertazione. La classica espressione in percentuale non è infatti adeguata in quanto accorpa proteine a significato fisiopatologico diverso.

G050

Motta A, D'Errico T, Tomassini L., Bonini P.A., Locatelli M.

VALUTAZIONE DI UN NUOVO METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL RECETTORE SOLUBILE DELLA TRANSFERRINA

Servizio integrato di Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale San Raffele Milano

La determinazione del recettore solubile della transferrina, (sTRF) ha acquisito in questi anni una notevole importanza in relazione al suo impiego sia nella diagnostica delle anemie marziali che come indicatore di espansione del pool eritropoietico.

Scopo del lavoro: Abbiamo valutato due metodiche per il dosaggio del sTRF applicabili a sistemi analitici automatici nefelometria BN II—Dade-Behring e turbidimetria Hitachi 917—Roche al fine di valutare le performance analitiche e la praticabilità.

Materiali e metodi: Sono stati esaminati 160 campioni di siero range (x) BN II: 0.73 - 3.37 mg/L, range (y) Hitachi 917 2.20 - 8.90 mg/L

Risultati: La precisione nella serie è stata valutata mediante la ripetizione (n=21) di pool di sieri a differente concentrazione ottenendo i seguenti risultati:

	x	d.s.	c.v.
BN II	0.73	0.02	2.73
	3.48	0.07	2.01
H917	2.20	0.07	3.18
	8.90	0.06	0.67

La precisione tra le serie è stata valutata utilizzando un pool di sieri a concentrazione media in differenti sedute analitiche (n=10) ottenendo i seguenti risultati

	x	d.s.	c.v.
BN II	1.48	0.03	2.02
H917	7.02	0.16	2.22

La linearità dei 2 metodi è pari a quella dichiarata dai produttori. La correlazione è risultata la seguente: $y = 2.466x + 0.186$ con $r = 0.991$

Conclusioni: I due metodi pur presentano differente sistema di standardizzazione e fornendo, di conseguenza, valori in assoluto differenti, mostrano una buona performance analitica. A nostro parere l'applicazione su strumentazione Hitachi 917-Roche, permette di consolidare su una sola stazione analitica tutte le analisi deputate alla valutazione dello stato marziale migliorando la gestione del lavoro.

G051

Del Rosso S., D'Errico T., Passerini G., Bonini P.A., Locatelli M.

L'ELETTROFORESI CAPILLARE NELLO SCREENING DELLA PROTEINA DI BENICE JONES: CONFRONTO CON METODICA DI RIFERIMENTO

Servizio integrato di Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale San Raffaele Milano

Scopo del lavoro: Abbiamo valutato la sensibilità, la specificità e l'applicabilità dell'elettroforesi capillare (CE) nello screening della proteina di Bence Jones (BJ) rispetto alla metodica di riferimento (IF).

Materiali e metodi: Sono stati esaminati 62 campioni di urine fresche del mattino con una proteinuria compresa tra 0.018 e 1.93 g/L.

Le urine sono state sottoposte a immunofissazione (IF) su acetato di cellulosa supportato (Helena) a 230 Vx15 min. con antisieri anti catene γ , α , μ , κ e λ (Dako) - la rilevazione della BJ è stata eseguita con oro colloidale (Alfabiotech) -. La CE è stata eseguita con lo strumento Paragon CZE 2000 (Beckman) utilizzando il sovrantante delle urine, precedentemente concentrate e desalificate mediante concentratori (Vivaspin). Per ovviare al limite dello strumento che esegue una diluizione standard 1:20 prevista per l'elettroforesi sieroproteica, alcuni campioni sono stati ripetuti aggiungendo un'aliquota di concentrato nel pozzetto di diluizione, per un totale di 90 tracciati eseguiti.

Risultati: Dei 62 campioni analizzati 34 campioni sono risultati positivi con entrambi i metodi, 18 sono risultati negativi con entrambi i metodi, 10 campioni sono risultati positivi su CE ma non su IF; nessun campione negativo su CE è risultato positivo su IF.

La sensibilità del metodo in esame è risultata pari al 100% mentre la specificità è risultata del 64%

La ripetizione di campioni sia positivi che negativi su CE non ha evidenziato cambi della classificazione

Conclusioni: L'utilizzo della CE appare quindi consigliabile nello screening della proteinuria di BJ in ragione della possibilità di automatizzare una procedura prevalentemente manuale. L'IF resta comunque il metodo di riferimento nel caso di riscontro di campioni positivi all'analisi con CE. Sono in corso ulteriori studi per valutare la possibilità di tipizzare direttamente la componente evidenziata alla CE con immunosottrazione.

G052

D'Errico T., Del Rosso S., Passerini G., Bonini P.A., Locatelli M.

IMMUNOSOTTRAZIONE IN ELETTROFORESI CAPILLARE NELLA IDENTIFICAZIONE DELLA PROTEINURIA DI BENICE JONES

Servizio Integrato di Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

Scopo del lavoro: Abbiamo valutato l'applicabilità, nell'identificazione della proteinuria di Bence Jones (BJ) dell'immunosottrazione, eseguita dopo elettroforesi capillare (CE), rispetto alla metodica manuale di riferimento - immunofissazione su acetato di cellulosa - (IF).

Materiale e metodi: Sono stati esaminati 20 campioni di urine del mattino di pazienti che, all'elettroforesi capillare di screening (Paragon CZE 200 Beckman) eseguita dopo trattamento di concentrazione e desalificazione mediante concentratori (Vivaspin), presentavano uno o più picchi anomali sospetti per la presenza di BJ. Tali campioni sono stati successivamente sottoposti a immunosottrazione utilizzando la medesima strumentazione automatica (diluizione impostata 1:7).

I dati sono stati comparati con i risultati ottenuti con metodica di riferimento (IF): elettroforesi dei campioni nativi di urina su acetato di cellulosa (Helena) a 230 V per 15 min. e immunofissazione in immersione con antisieri anti-catene γ , α , μ , κ , λ (Dako) diluiti con PEG 4% e colorazione con oro colloidale (Alfabiotech).

Risultati: I 20 campioni esaminati sono risultati dopo IF: 5 negativi per proteinuria di Bence Jones (assenza di bande, ladders di catene leggere, presenza di bande di catene leggere legate)

1 positivo per catene κ e λ

9 positivi per catene κ

5 positivi per catene λ

La concordanza dei dati ottenuti è stata la seguente: negativi (5/5)

positivi κ e λ (1/1)

positivi κ (9/9)

positivi λ (4/5).

L'accuratezza totale è stata del 95 %.

Conclusioni: I dati ottenuti ci incoraggiano nel proseguire la valutazione sull'impiego della immunosottrazione eseguita con strumentazione automatica, al fine di approfondire i casi che si presentano positivi allo screening della BJ tramite CE. Tale metodica permette una drastica riduzione dei tempi analitici e di refertazione con una buona performance analitica.

G053

Muratore M.T., Neri C., Meschini L.°, Feriozzi S.°, Massimetti C.°, Costantini S.°, Carrozza R., Ancarani E.°

UN NUOVO MARKER DELLA FUNZIONE RENALE NEL PAZIENTE PORTATORE DI TRAPIANTO RENALE: LA CISTATINA C

Laboratorio Analisi, °Nefrologia e Dialisi, ASL Viterbo, Ospedale Civile di Viterbo ASL VT, Via S. Lorenzo, 01100 Viterbo

La Cistatina C (CysC), il cui valore plasmatico è indipendente da alterazioni dovute a stati infiammatori immunitari e di malnutrizione, è stata utilizzata quale marker plasmatico, a basso costo, della velocità di filtrazione glomerulare. Numerosi studi testimoniano come la CysC correli, in maniera ottimale con la clearance dell'inulina e con la clearance dello Ioxenolo meglio della clearance della creatinina (Hayaschi T *Nephron* 1999 – Bostom AG *Am J Soc Nephrol* 1999).

La valutazione della funzione renale (GFR) nel paziente sottoposto a trapianto renale non è, con i parametri abituali, di facile interpretazione. Infatti la terapia immunosoppressiva con ciclosporina (al-Harbi N *Am J Nephrol* 1997) e lo stato nutrizionale (Nonkivell BJ *Transplantation* 1995) rendono imprecisa e sovrastimata la valutazione del GFR utilizzando la creatinina o la sua clearance. Il ricorso a metodi come la clearance dell'inulina o ai radioisotopi non è né pratico né economico. Abbiamo preso in esame una popolazione di pazienti nefropatici afferenti al nostro ambulatorio, 25 M e 18 F (tot 43), età media 45 ± 13 , di questi 15 erano stati sottoposti a trapianto renale i rimanenti 28 avevano patologie di interesse nefrologico. In tutti i pazienti è stata valutata la CysC con metodo nefelometrico (BN II Dade-Behring). La regressione statistica eseguita tra la CysC e l'inverso della creatinina eseguita su tutti i pazienti ha fornito una $R=0,91$ con un $p<0,001$, in accordo con la letteratura. Abbiamo diviso la popolazione in pazienti che avevano eseguito un trapianto renale (Gruppo A) e quelli che non avevano eseguito un trapianto renale (Gruppo B). Nel gruppo B la regressione tra CysC e inverso della creatinina forniva una $R=0,81$ mentre nel gruppo A era $R=0,86$. Abbiamo diviso i due gruppi in pazienti con GFR maggiore o minore di 40 ml/min. Nel gruppo A la correlazione sopra 40 ml/min era inesistente con una $r=-0,20$ e sotto 40 ml/min invece raggiungeva valori di $r=0,94$. Nel gruppo B la significatività si manteneva costante sopra e sotto un GFR di 40 ml/min. Il nostro studio dimostra come nel paziente portatore di trapianto renale si perda la correlazione tra creatinina e CysC quando sono presenti valori di $GFR < 40$ ml/min ed evidenzia come la clearance della creatinina non offra sufficienti garanzie nella valutazione della funzione renale. In conclusione riteniamo che la CysC possa essere abitualmente utilizzata come un più precoce ed obiettivo marker nella valutazione della funzione renale nel paziente portatore di trapianto renale.

G054

Balduini A., Merlini G., Campana C., Arbustini E., Ceresa M., Melzi d'Eril G.V., Tinelli C., Bosoni T., Poggi N., Frè D., Viganò M., Moratti R.

TROPONINA T, PROTEINA C-REATTIVA E BIOPSIA ENDOMIocardICA PER LA DIAGNOSI DI RIGETTO ACUTO DEL CUORE TRAPIANTATO

Lab. Biotecnologie, Serv. Analisi Chimico-Cliniche, Div. Cardiochirurgia e Cardiologia, Dip. Patologia Umana, IRCCS San Matteo, Dip. Biochimica, Univ. di Pavia e Dip. Scienze Biomed. Univ. Insubria, VA

La biopsia endomiocardica (BEM) è attualmente il gold standard per la diagnosi di rigetto acuto cardiaco. Tuttavia, questa procedura è invasiva con frequenza di complicanze compresa fra l'1.5 ed il 6%. Inoltre, utilizzando da tre a cinque siti di biopsia, la sensibilità diagnostica può variare notevolmente (dal 75 al 98%). Gli obiettivi del nostro studio sono: 1) valutare la possibilità di predire il rigetto acuto in base a marcatori nel sangue periferico; 2) aumentare la sensibilità diagnostica della BEM per mezzo di marcatori valutati nel sangue venoso refluo dal muscolo cardiaco. Sono stati determinati marcatori della fase acuta (SAA e PCR, per mezzo di immunonefelometria "particle-enhanced") e marcatori di danno miocardico (Troponina I, cTnI, mioglobina, CK-MBmassa, per mezzo di immunoassay fluorogenico; e Troponina T, cTnT, per mezzo di immunoassay in elettrochemiluminescenza). Sono stati studiati prospettivamente 27 pazienti consecutivi, 23 maschi e 4 femmine, sottoposti a trapianto di cuore presso l'IRCCS Policlinico San Matteo. I pazienti sono stati trattati con terapia immunosoppressiva standard. Dalla seconda settimana dal trapianto, contemporaneamente all'esecuzione della BEM, si sono raccolti campioni di sangue centrale (dal seno coronarico) e periferico per la determinazione dei marcatori. Sulla popolazione di 27 pazienti si sono valutate 65 BEM: 37 presentavano un quadro non patologico, 12 mostravano un singolo infiltrato perivascolare (grado 1a) e 16 presentavano infiltrati perivascolari multipli, ma senza evidenza di necrosi miocardica (grado 1b). I marcatori sono stati determinati sui 65 campioni di sangue centrale e periferico. Dei 6 marcatori studiati solo la cTnT e la PCR hanno presentato un incremento significativo nei pazienti con grado di rigetto 1b. In particolare la TnT risultava significativamente aumentata solo nel sangue centrale dei pazienti con rigetto di grado 1b ($p=0.03$); mentre la PCR era significativamente aumentata sia nel sangue centrale ($p=0.01$) che in quello periferico ($p=0.04$). I dati preliminari di questo studio prospettico indicano che il dosaggio della cTnT nel sangue centrale può fornire utili informazioni sul danno miocardico integrando i dati ottenibili dalla BEM. L'incremento della PCR nel sangue periferico potrebbe rappresentare un indice di allarme per la presenza di un rigetto acuto.

G055

Passerini G., Del Rosso S., Bonini P.A., Locatelli M.

CARATTERIZZAZIONE DELLE CRIOGLOBULINE MEDIANTE IMMUNOSOTTRAZIONE

Servizio integrato di Medicina di Laboratorio, IRCCS
Ospedale San Raffaele Milano

Introduzione: La caratterizzazione delle CRG rappresenta il criterio fondamentale per il corretto inquadramento diagnostico e il monitoraggio terapeutico delle sindromi crioglobulinemiche (SC), pertanto è fondamentale disporre di un metodo sensibile e praticabile nella routine di ogni laboratorio ospedaliero. Scopo del nostro lavoro è verificare la possibilità di utilizzare strumentazione automatica dedicata a elettroforesi e caratterizzazione di componenti monoclonali sieriche, anche per la caratterizzazione delle CRG. Materiali e metodi: *Fase preanalitica:* dopo stima del crioprecipitato, ed eliminazione del siero surnatante, si procede al lavaggio delle CRG con tampone fosfato pH 7.2 mantenuto a 4°C, centrifugando a 4°C per 15 minuti a 2000 g. Si eseguono tre lavaggi risospendendo il crioprecipitato in PBS e agitando su vortex prima di procedere alla centrifugazione. Dopo centrifugazione si elimina completamente il surnatante evitando di perdere materiale e al termine del terzo lavaggio, dopo eliminazione del surnatante, si risospendono le CRG in un uguale volume di PBS fresco e si agita bene su vortex. Si miscolano 100µL di CRG lavate e risospese in PBS come descritto con 100µL di soluzione di ditiotreitolo (DTT) 0.5M e si incuba in bagno termostato a 37°C per 15 minuti. *Fase analitica:* al termine dell'incubazione si procede con l'immunosottrazione (ISE) su Paragon CZE 2000 (Beckman) impostando la diluizione 1:2. Sul campione nativo si esegue l'immunofissazione (IFE) su gel d'agarosio (Hydrasys Sebia) utilizzando un programma di migrazione a 37°C. Risultati: Sono stati esaminati 30 campioni con criocrito compreso tra tracce <1% e 43%.

6% dei campioni sono classificati di I tipo, 6% di tipo III, 88% di tipo II. La caratterizzazione delle CRG in ISE concorda con la IFE nel 94% dei casi esaminati. In crioprecipitati con elevata attività reumatoide il trattamento con DTT, eliminando le interferenze che si manifestano su gel d'agarosio, facilita l'interpretazione del pattern. Il volume ridotto di materiale richiesto per l'analisi rende possibile l'esecuzione del test anche in caso di criocrito <1%. Sono state ripetute le ISE di uno stesso crioprecipitato o di diversi crioprecipitati dello stesso paziente con risultati del tutto sovrapponibili, a conferma della buona riproducibilità della procedura sia preanalitica che analitica del metodo. Conclusioni: La standardizzazione di un metodo per caratterizzare il crioprecipitato anche in campioni con CRG presenti in tracce era il principale obiettivo del nostro lavoro e riteniamo di averlo raggiunto. La semplicità del metodo rende possibile ad ogni laboratorio ospedaliero l'esecuzione in routine di questa analisi utilizzando un sistema automatico in alternativa ai metodi semiautomatici o manuali già consolidati.

G056

Lanfranco G., °Battaglio S., °Boccardo M., Campo A., Gai M., Mezza E., Piccoli G.

TIPIZZAZIONE DELLE PROTEINE URINARIE: CONFRONTO TRA SDS AGE E IMMUNO- FISSAZIONE SU PIASTRA

Cattedra di Nefrologia dell'Università e Divisione di Nefrologia, Dialisi, Trapianto, °Divisione Universitaria di Ematologia, Az. Osp. S. Giovanni Battista – Torino

Lo studio qualitativo delle proteine urinarie può dare importanti informazioni sulla presenza e natura di patologie renali ed extrarenali.

Scopo del nostro lavoro è il confronto dei risultati dell'analisi di campioni di urine native pervenuti al laboratorio nefrologico per la tipizzazione (180) o inviati al laboratorio di ematologia (70) per la ricerca della proteinuria di Bence Jones (BJ) con due distinte metodologie elettroforesi SDS-AGE (kit Hydragel proteinurie, Sebia Italia srl, Firenze) e immunofissazione su piastra (CSI-rene, Bioci srl, Airasca, To). Nell'SDS-AGE le proteine urinarie in presenza del detergente anionico sodio dodecilsolfato (SDS) in eccesso vengono separate con elettroforesi su gel di agaroso ad alta concentrazione in base al peso molecolare. Il CSI-rene invece caratterizza la proteinuria mediante 6 antisieri specifici per catene leggere libere kappa o lambda, IgG, albumina, α_1 microglobulina, transferrina.

Nel classificare le 180 proteinurie del laboratorio nefrologico il Csi-rene è più sensibile per le tubulari pure (14 casi) ma non rileva la presenza di componenti tubulari a basso peso molecolare (sino a 10 Kd), che meglio correla con la gravità del danno tubulointerstiziale e la tendenza alla progressione in insufficienza renale (21 casi in SDS-AGE). La proteinuria nei doppi trapianti rene-pancreas o in tumori avanzati della testa del pancreas (3 casi) è risultata non tipizzabile. Tra i 70 campioni del laboratorio ematologico 50 erano positivi per proteinuria di BJ con CSI-rene (tutti confermati dall'immunofocalizzazione elettroforetica, IFE: sensibilità e specificità 100%) e solo 45 con SDS-AGE (sensibilità 90%). In assenza di danno tubulare la presenza di una banda di 25 Kd in SDS-AGE o di un solo antisiero anti catene leggere positivo in CSI-rene è risultata sempre una catena leggera monoclonale.

In conclusione, entrambe le tecniche sono in grado di classificare le proteinurie e individuare in particolare quelle da iperafflusso di catene leggere monoclonali. Il CSI-rene è più indicato come test iniziale da integrare con IFE (conferma proteinuria BJ) e SDS-AGE (ricerca componenti a basso peso molecolare nei casi con proteinuria tubulare). Le Bricon T., Erlich D., Bengolifa D., Dussaucy M., Garnier J.P., Bousquet B. "SDS-agarose gel electrophoresis of urinary proteins: application to multiple myeloma" *Clinical Chemistry* 44: 6, 1191-1197 (1998)

G057

Aloe R.(1), Visintini D.(2), Gnocchi C.(1), Saviola D.(2), Ciapini A.(1), Monica C.(1)

UN NUOVO METODO IMMUNOFISSATIVO, PER LA RICERCA DEI QUADRI OLIGOCLONALI NEL LIQUOR E SUO CONFRONTO CON ISOELETTROFOCALIZZAZIONE E RISONANZA MAGNETICA.

- (1) 1° Laboratorio Analisi Ematochimiche – Azienda Ospedaliera di Parma
- (2) Clinica Neurologica – Università degli Studi di Parma

La Sclerosi Multipla è una malattia la cui eziopatogenesi è ancora indefinita. La componente "Autoimmune" nella sclerosi Multipla ha un ruolo diverso e di difficile connotazione in ogni paziente. Scopo del lavoro è stato quello di confrontare due metodiche per la ricerca di quadri oligoclonali nel liquor, applicate nei pazienti con Sclerosi Multipla definita clinicamente e attraverso la Risonanza magnetica. Precisamente, è stato valutato il sistema diagnostico Hydrasys (Sebia) che utilizza il kit Hydragel 6 CSF (Sebia), rispetto al metodo di Isoelettrofocalizzazione onde valutare la sua attendibilità e praticabilità nel laboratorio di analisi. Fino ad ora sono stati valutati 50 pazienti di cui 41 affetti da Sclerosi multipla e 9 risultati sani. Una prima valutazione dei risultati ha consentito di trarre alcune considerazioni. Il metodo Hydragel 6 CSF presenta: 1-Un grado di sensibilità e specificità analitica paragonabile sia alla Isoelettrofocalizzazione che alla Risonanza Magnetica. 2-Una correlazione con la Risonanza Magnetica nelle sue espressioni midollare e cerebrale in ordine al numero di bande oligoclonali reperite. 3-Una possibile correlazione tra numero di bande oligoclonali reperite e gli indici prognostici valutati anche retrospettivamente. I risultati, da confermare su una casistica più ampia sono rappresentati nella seguente tabella:

Metodo in studio	Sensibilità analitica rispetto: Isoelettrofoca	Sensibilità analitica rispetto: Isoelettrofoca Risonanza M
6 CSF	La stessa	

Sensibilità analitica rispetto: Isoelettrofoca	Specificità diagnostica rispetto: Isoelettrofoca Risonanza M
La stessa	Falsi pos. = 0% Veri neg. = 100% Efficacia = 100%

Campioni studiati = 50 di cui 41 positivi e 9 negativi. Pertanto, riteniamo che il metodo proposto presenti caratteristiche di attendibilità, rapidità di esecuzione e facilità di utilizzo nel laboratorio di analisi.

G058

Schlett R.¹, Brömmel-Hildebrand G.¹, Rotgeri A.², Bergmann A.², Mack M.¹

LIAISON® BRAHMS PCT® - AN AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF PROCALCITONIN

¹Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

²BRAHMS Diagnostica, Berlin, Germany

Procalcitonin (PCT) is a 116 amino acid peptide which undergoes post-translational proteolysis into the mature hormone, calcitonin composed of 32 amino acids. PCT, which is low or undetectable in serum of healthy humans, reaches high concentrations in patients with severe bacterial infections, septicaemia, meningitis or multiple organ dysfunction and decreases rapidly after appropriate antibiotic therapy. Moreover, in patients with acute viral infection or with inflammatory diseases, PCT is low. An immunoassay utilising chemiluminescence and paramagnetic particles has been developed for the new fully automated random access LIAISON® immunoassay analyser. The LIAISON® BRAHMS PCT® assay is a two-step immunoluminometric assay using two highly specific monoclonal antibodies. On the LIAISON immunoassay analyser, 75 µl of sample is incubated together with 100 µl of tracer antibody. After 10 min incubation, 20 µl of the monoclonal antibody coated on the paramagnetic particles is added. After another 10 min incubation and a washing step, the chemiluminescent signal is generated. The LIAISON BRAHMS PCT covers a measuring range of 0-500 ng/ml. The within-run % cvd is between 5 and 10%, the between-run % cvd is between 7 and 14%. The analytical sensitivity of the assay is calculated with 0.2 ng/ml. Using spiked sera no high-dose hook effect is observed for concentrations up to 900 ng/ml. Preliminary correlation experiments demonstrate very good agreement with the commercially available BRAHMS LUMitest® PCT yielding a correlation coefficient calculated with 0.979 and a slope of 1.051. In conclusion, LIAISON BRAHMS PCT offers a rapid and reliable assay for the fully automated determination of this interesting and valuable inflammation parameter.

Casalin P.¹, Giuntini I.¹, Bugatti A.¹, D'Amico Y.²

LIAISON® CKMB: DEVELOPMENT OF A CHEMILUMINESCENCE CKMB ASSAY FOR USE ON THE FULLY AUTOMATED LIAISON® RANDOM ACCESS ANALYSER

¹Byk Gulden Italia, Cormano, Italy

²Sangtec Medical, Bromma, Sweden

Acute myocardial infarction (AMI) is traditionally diagnosed using WHO established criteria. These are: patient clinical history (prolonged chest pain), abnormal electrocardiogram (ECG) and assays for increased levels of serum enzyme and protein markers. In practice, serial measurements of serum markers are often required to confirm inconclusive data obtained from the patient's ECG or ambiguous symptoms derived from small infarcts or unstable angina. Current technologies employed for these measurements often present problems with specificity and sensitivity, precision, and time required to obtain results. This last factor can cause delays of many hours in diagnosis and may lead to thrombolytic therapy either administered unnecessarily or withheld in unconfirmed AMI. The salvage of the cardiac muscle by means of thrombolytic agents or coronary transluminal angioplasty is only effective when arterial recanalisation is achieved within few hours after AMI. We report the development of a new chemiluminescent CKMB immunoassay for the rapid diagnosis of AMI. This assay design is fast and simple, and this immunochemiluminescent system will give reliable, sensitive assays of serum markers for AMI. CKMB is measured from 100 µl serum samples using a single-step CKMB immunoassay. Like all LIAISON assays LIAISON CKMB uses paramagnetic particles (Dynabeads®) for separation and isoluminol-based chemiluminescence for the determination of the immunocomplex. The serum sample is incubated with 20 µl coated paramagnetic particles and 270 µl assay buffer and isoluminol-labelled monoclonal antibody for 10 min prior to the wash cycle. Chemiluminescence is measured after subsequently adding two starter reagents (200 µl resp.) to the immunocomplex. Sample concentrations are calculated using a stored master curve recalibrated with two calibrators for each lot of reagents. First results can be obtained in approx. 20 min. The assay was set up both on native sera or pools, pathological and normal, and on standards and calibrators prepared with pure CKMB in a synthetic diluent. The master curve covers the range from 0 to 500 ng/ml. The analytical sensitivity – defined as the value exceeding the measuring signal of the 0 standard by 3 standard deviations – was determined at concentrations of 0.20-0.23 ng/ml. Within-assay precision is <10% CV for CKMB 1-4 ng/ml, <7% CV for CKMB >4 ng/ml. Inter-assay precision is <15% CV for CKMB 1-4 ng/ml, <10% CV for CKMB >4 ng/ml. Samples run on LIAISON CKMB show a good linearity upon dilution: +/- 10% of the theoretical sample value. The high-dose hook effect was found at 6,000 ng/ml. No interference was seen by cholesterol (up to 600 mg/dl), triglycerides (up to 4,000 mg/dl), haemoglobin (up to 200 mg/dl) and bilirubin (up to 60 mg/dl). A preliminary correlation study (n=26) showed the following correlation coefficients and slopes, resp.: 0.99, 1.57 with Dade Stratus®; 0.97, 1.57 with Dade RXL Dimension®; 0.99, 1.16 with Roche Elecsys®. In conclusion, LIAISON CKMB is a reliable and fast assay for fully automated determination of serum mass CKMB.

Oed M., Nassabi C., Amtmann R., Schlett R., Mack M.

LIAISON® TROPONIN I – DEVELOPMENT OF A HIGHLY SENSITIVE AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF TROPONIN I.

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

An immunoassay utilising chemiluminescence and paramagnetic particles (Dynabeads®) has been developed for the new fully automated, random access LIAISON® immunoassay analyser. Due to the fact that healthy persons do not show any detectable amount of cardiac Troponin I (cTnI) in the serum, the major goal of the assay development was to achieve the lowest possible 97.5 percentile for defined healthy persons and a very good discrimination from this point to be able to recognise patients with minor myocardial damage. The LIAISON Troponin I assay uses a combination of a monoclonal antibody (solid phase) and affinity-purified polyclonal antibody (tracer) together with a new recombinant antigen as standard material (aa 28-110 linked to cTnC). The antibodies used are specific for the most stable region of the cTnI molecule (aa 30-110).

A specially designed unique Reagent Integral contains the specific reagents; the on-board stability of these reagents is given over a long period (2 weeks). The assay works with a 2-point calibrated master curve. 100 µl sample is added to 200 µl tracer and 20 µl antibody-coated magnetic particles. After 10 min incubation the particles are separated, washed and the chemiluminescent signal is generated by the injection of two ready-to-use trigger solutions. The time to the first result is only 15 min. The assay with an extended standard range up to 100 ng/ml shows no detectable cross-reactivity to skeletal Troponin I, cardiac Troponin T, and cardiac Troponin C (<0.05%). One hundred and sixty normal blood donors showed a 97.5 percentile of <0.02 ng/ml. The analytical sensitivity determined with <0.005 ng/ml (2s) and the functional sensitivity (CV below 20%) <0.03 are excellent. The assay shows very good within-run CVs (0.04-70 ng/ml: <5%), between-run CVs (0.04 ng/ml: <15%, 5.3 ng/ml: <4%, 70 ng/ml: <7%), linearity (d <10%) and recovery (d <10%). In a preliminary study on 50 patients with acute coronary syndrome LIAISON Troponin I was able to detect all patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris and showed a good correlation to Dade Stratus, Dade Dimension, CHIRON ACS 180 and ABBOTT Axsym. In summary, the LIAISON Troponin I assay together with the new LIAISON immunoanalyser is a very rapid, accurate and highly sensitive method for the quantitative determination of total Troponin I in serum.

G061

Di Serio F.¹, Di Candia B.¹, Agnino A.², Capovivo V.², Pansini N.¹

SERUM S100 RELEASE AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING: PULSATILE VERSUS NONPULSATILE ROLLER AND CENTRIFUGAL PUMPS

¹Clinical Pathology I°, Policlinico Bari, ²Department of Emergency and Organ Transplantation, Division of Cardiovascular Surgery, University of Bari

OBJECTIVE: S100 protein has been suggested as a reliable serum marker for cerebral complication after cardiac surgery and CPB. Moreover, it has been shown that centrifugal pumps (CP) do not significantly decrease S100 release compared to traditional roller pumps with nonpulsatile flow (NP). Aim of this study was to investigate the potential neurological benefit of roller pumps with pulsatile flow (P) versus both conventional NP roller and (C) pumps, by using S100 as a marker for cerebral injury. **METHODS:** Forty-five patients without neurologic problems or carotid stenoses, underwent CABG using ECC. Cases were randomly assigned to three groups (n=15). Serial blood samples (preoperative, end of by-pass, 4, 12 and 36 hs after CPB) were taken and analyzed for S100 using an immunoluminometric assay (Byk-Sangtek). Comparison between P and NP groups were made using a paired t-test. Comparison between roller and centrifugal pumps were made using ANOVA. Data are expressed as mean plusmn SD (in ng/mg) and considered significant if the p value is less than 0.05.

RESULTS: Groups were matched for age, sex, number of grafts, CPB and cross-clamp times. Postoperative serum S100 levels were significantly higher in both P and NP groups than preoperative levels (2.52 ± 2.16 and 2.3 ± 1.57 vs. 0.05 ± 0.05 and 0.1 ± 0.06 , $p < 0.01$) and corresponded to peak values. Nevertheless, when compared at each time point, S100 serum levels were not significantly different between NP, P roller and C pumps (postoperative $p = 0.19$).

CONCLUSION: S100 levels increase after CABG. Roller pumps with P flow do not significantly decrease S100 release when compared to NP flow roller and C pumps.

G062

Rocchi M.B.L.*, Perlini C.*, Ciatti R.°, Burrioni M.°

TSH E STAGIONALITA': UN FATTORE DI RISCHIO PER L'IPOTIROIDISMO CONGENITO?

* Istituto di Biomatematica, Università di Urbino;
° U.O. di Neuropsichiatria Infantile, Centro Screening Neonatale Regione Marche, Ospedale di Fano.

Alcuni lavori in letteratura segnalano la stagione di nascita come fattore di rischio per l'Ipotiroidismo Congenito (IC) (Virtanen et al. 1989; Thalhammer 1981). Dati contrastanti riguardano invece le variazioni stagionali dell'ormone TSH (Coiro et al. 1994; Konno & Morikawa 1982; Hamada et al. 1984).

In questo lavoro sono stati in un primo tempo considerati $n = 88$ pazienti affetti da IC, i cui dati sono stati ottenuti dallo screening neonatale per l'IC della regione Marche (il cui centro screening di riferimento è situato presso il Reparto di Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale di Fano) nel periodo 1981-1996.

I dati sono stati analizzati con tecniche di statistica circolare: test di Roger (1977) e stima delle funzioni di densità di probabilità con metodo kernel di Fisher (1989), modificato da Rocchi et al. (1995).

Non si sono evidenziate stagionalità di rischio per la patologia, né sull'intero campione né con analisi per sottogruppi.

In una seconda fase è stato considerato il livello di TSH di tutti i neonati sottoposti a screening nel periodo 1989-1998, mediante analisi immunofluorimetrica Delfia dei dried spot. Tali dati sono stati sottoposti a analisi statistica MMVL (Rocchi & Ghiandoni 1999; Rocchi, preprint) per la ricerca di periodicità sconosciute in ritmometria. Nessun trend ciclico, né stagionale né di altro periodo, è risultato significativo.

In definitiva, non vengono confermate né le ipotesi di Virtanen et al. (1989) e Thalhammer (1981) sulla stagione di nascita come fattore di rischio per l'IC, né i risultati di Konno & Morikawa (1982) e di Hamada et al. (1984) sulle variazioni stagionali dei livelli di TSH.

Riferimenti bibliografici:

- Virtanen M et al. Acta Paediatr Scand 78: 67-73, 1989
Thalhammer O. Klin Padiatr 193: 375-7, 1981
Coiro V et al. Biol Psychiatry 35: 36-41, 1994
Konno N, Morikawa K. J Clin Endocrinol Metab 54: 1118-24, 1982
Hamada N et al. Metabolism 33: 215-8, 1984
Roger JH. Biometrika 64: 152-6, 1977
Fisher NI. J Struc Geol 11: 775-8, 1989
Rocchi MBL et al. St Urb Fac Farm C 37: 67-75, 1995
Rocchi MBL, Ghiandoni G. Biol Rhythm Res 30: 563-72, 1999

Rocchi M.B.L.*; Perlini C.*; Ciatti R.°, Burroni M.°

IL VALORE DI CUT-OFF DEL TSH SU DRIED-SPOT PER IL RECALL NELLO SCREENING NEONATALE PER IPOTIROIDISMO CONGENITO: UNA SCELTA STATISTICA

* Istituto di Biomatemica, Università di Urbino;

° U.O. di Neuropsichiatria Infantile, Centro Screening Neonatale Regione Marche, Ospedale di Fano.

Il problema pratico di fissare il valore di cut-off del TSH su dried-spot oltre il quale effettuare una riprova ed un eventuale recall per la valutazione su siero appare di primaria importanza nell'ambito dello screening neonatale per Ipertiroidismo Congenito (IC).

Prioritariamente, tale cut-off deve garantire che nessun soggetto affetto da IC sfugga allo screening, mentre secondariamente, per ovvii motivi (economia di tempo, denaro e risorse umane) deve limitare al minimo il numero di recall che risulteranno negativi al test su siero e quindi, in ultima istanza, inutili.

Se è evidente che la prima ragione deve assolutamente prevalere, è altrettanto vero che è forse possibile intervenire sulla seconda senza intaccare la prima.

In questo lavoro è stato considerato il livello di TSH di tutti i neonati della regione Marche (il cui centro screening di riferimento è situato presso l'U.O. di Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale di Fano) sottoposti a screening nel periodo 1989-1998, mediante analisi immunofluorimetrica Delfia dei dried spot.

In una prima fase si è verificata l'ipotesi di normalità (e lognormalità) mediante differenti modalità: (a) metodi grafici (P-P plot; Q-Q plot), (b) metodi basati sui momenti terzo e quarto (indici di asimmetria e curtosi), (c) test statistici (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, Michael, D'Agostino, Cramer-Von Mises, Anderson-Darling).

In un secondo tempo si sono calcolati i valori di riferimento per il TSH su dried-spot con differenti metodiche, quali il metodo non parametrico di Lee Herrera (1958), la trasformazione potenza di Box & Cox (1964) secondo l'algoritmo proposto da Harris & Boyd (1995) e la scomposizione in componenti gaussiane di Bhattacharya (1967).

Infine si è proceduto a confrontare la simulazione dei recall basati su questi metodi, con la situazione reale dei recall, che attualmente avvengono, nel Centro Screening Neonatale della Regione Marche, sulla base di un cut-off fissato in 10 µU/ml (pari al 99° percentile).

Riferimenti bibliografici:

Lee Herrera BS. J Lab Clin Med 52: 34-42, 1958

Box GEP, Cox DR. J R Stat Soc B 26: 211-52, 1964

Harris EK, Boyd JC. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. Dekker, 1995

Bhattacharya CG. Biometrics 23: 115-35, 1967

Accinni R.¹, Bartesaghi S.², Cursano C.¹, De Leo G.², Galluzzo C.², Maiorana A.³, Naggi P.¹, Vegezzi G., Parodi O.¹

SCREENING NEONATALE DI OMOCISTINURIA IN HPLC DA SPOT DI SANGUE PRELEVATI SU CARTA

¹Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Milano; ²Ospedale "Sacra Famiglia" FBF-AFaR, Erba (CO); ³Ospedale S. Giovanni Calibita FBF-AFaR, Roma.

L'omocistinuria (HCU), dovuta a una mutazione genetica nel metabolismo della metionina, porta a ritardo mentale, "ectopia lentis", osteoporosi e patologia tromboembolica spesso fatale (1). L'identificazione e il tempestivo trattamento della HCU durante il periodo prenatale può prevenire e spesso ridurre la severità della malattia. In una popolazione di neonati si vuole determinare la frequenza dell'HCU misurando il livello di omocisteina plasmatica totale (tHcy) proveniente da spot di sangue su carta da filtro. Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un nuovo metodo per la diagnosi dell'HCU utilizzando spot di sangue su carta prelevati ai neonati dal tallone. Questo metodo si basa sulla determinazione di tHcy in HPLC con rivelatore fluorimetrico. Un disco di carta, dal diametro di 5 mm contenente lo spot di sangue e ottenuto mediante punzonatura, viene incubato con 100 µL di tampone borato contenente tri-*n*-butilfosfina e ammonio-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato per 1 ora a 60°C. Al termine dell'incubazione 10 µL vengono analizzati in HPLC utilizzando una colonna a fase inversa Discovery C18 Supelco eluita con tampone fosfato 0,1 M e 8% acetonitrile, pH=2.1. La validazione del metodo (linearità, precisione, recupero e stabilità della tHcy) è stata eseguita impiegando le stesse metodologie utilizzate per i campioni. La linearità è stata valutata aggiungendo concentrazioni crescenti di Hcy standard (Hcy std) a sangue intero con un basso contenuto di tHcy. La curva di calibrazione è risultata lineare nel range 9.375-150 µM $r=0.999$. La precisione intra-assay è stata calcolata su 10 differenti estrazioni dello stesso campione di sangue (150 µM) eseguite nello stesso giorno, mostrando un coefficiente di variazione CV(%) = 2.6. Il test di recupero è stato eseguito aggiungendo due diverse concentrazioni di Hcy std (9.37 e 150 µM) allo stesso campione di sangue (n=10); il recupero analitico calcolato come recupero % = $100 \times (tHcy + Hcy\ std) - tHcy / Hcy\ std$ varia da 97 a 102 %. Con questo metodo isocratico, semplice, rapido, sensibile, accurato, in grado di processare un elevato numero di campioni e sufficientemente economico, sono stati dosati circa 250 spot di neonati ottenendo una media di $3.5 \pm 1.5 \mu M$.

BIBLIOGRAFIA

1) S.H. Mudd, H.L. Levy, F. Skovby. In: Scriver CR, AL. Beaudet, WS. Sly, D. Valle, (editors). The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. Vol. 1. New York: McGraw-Hill. 1995 p.1279.

G065

Baraldi E., De Santis M.C., Grisolia C., Roli L., Baraghini G.F.

SCREENING BIOCHIMICO PRENATALE PER LA SINDROME DI DOWN: ESPERIENZA DEL POLICLINICO DI MODENA

Laboratorio Endocrinologia, Azienda Ospedaliera Policlinico, Via del Pozzo 71, 41100 MODENA

SCOPO Il Laboratorio di Endocrinologia, certificato ISO 9002, e la Clinica Ostetrica del Policlinico di Modena hanno attivato da 4 anni un percorso per lo screening biochimico prenatale della Sindrome Down (SD) allo scopo di rispondere alle molteplici richieste del territorio. Il test viene offerto alle donne gravide per selezionare le pazienti con un elevato rischio individuo-specifico di gravidanza affetta da SD, al di là dell'età, e per cui risulti indicata la successiva diagnosi prenatale (amniocentesi).

METODOLOGIA USATA Lo screening prevede la datazione ecografica della settimana di gestazione, il dosaggio su siero di α -fetoproteina, β -HCG libera ed Estriolo libero (da cui il nome TRITEST) e l'elaborazione computerizzata dei dati per il calcolo del rischio. Il dosaggio in immunofluorescenza viene eseguito con un analizzatore automatico (AutoDELFA Wallac Oy) che acquisisce le liste di lavoro da un programma per la gestione del Tritest (Down's risk for MultiCalc triple label). Il CQ interno è realizzato con un pool di sieri preparato dal laboratorio stesso, tarato sui valori della 16^o-17^o settimana di gravidanza. Tutte le fasi del processo, dall'inserimento dei dati anamnestici al calcolo delle concentrazioni e del rischio, sono tenute sotto controllo per ridurre al minimo l'errore. Il programma di gestione del Tritest elabora il rischio su quanto proposto da Wald; le mediane di ogni analita sono state calcolate per la 16^oe 17^o settimana su una popolazione di oltre 1000 pazienti. Il valore di cut-off del rischio adottato nel nostro centro è **1:350**, in coerenza con quanto indicato dal piano sanitario nazionale relativamente alla minima età materna a cui viene concessa l'amniocentesi.

RISULTATI Le mediane calcolate sono in accordo con quelle di uno studio multicentrico eseguito su gravide sane in Gran Bretagna nel 1992. Dall'attivazione del Tritest a tutt'oggi si sono sottoposte allo screening 1990 gestanti, con età media di 30,5 anni. Il test è risultato positivo per 139 pazienti, pari al 7% della popolazione, in seguito sottoposte ad amniocentesi con esito negativo: questo dato pertanto rappresenta il valore di falsi positivi da noi riscontrato, in accordo con la letteratura.

CONCLUSIONI Nello screening biochimico della SD è critica la scelta del cut-off di rischio, da cui dipende la capacità del metodo di individuare i feti affetti e la % di falsi positivi. Altro elemento critico è la corretta datazione ecografica del feto al momento del prelievo. La nostra esperienza ci conferma l'importanza di eseguire questo test in centri specializzati dove le varie fasi del processo siano standardizzate e il personale opportunamente formato.

G066

Auriemma L., *Signorelli S., Felini S., Moscheni C.

C-13 UREA BREATH TEST (UBT) NEL CONTROLLO DELL'ERADICAZIONE DA HELICOBACTER PYLORI (HP).

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Bolognini, Seriate (BG); *U.O. Gastroenterologia, OORR, Bergamo.

L'UBT rappresenta il test di scelta non invasivo, sicuro ed accurato per la determinazione dell'infezione da HP. Il test si basa sull'idrolisi, indotta dall'attività ureasica dell'Hp, dell'urea marcata con C-13, in ammoniaca e 13-CO₂ assorbita poi attraverso le pareti gastriche e quindi espirata. **Scopo:** verificare - mediante UBT - l'efficacia eradicante degli schemi terapeutici ai quali sono stati sottoposti i pazienti HP positivi, da parte dei medici del territorio afferente al nostro laboratorio analisi. **Materiali e Metodi:** 512 pazienti (280 F, 232 M) dell'età media di 51 anni (18-82) Hp positivi all'istologia e/o al test rapido dell'ureasi sono stati sottoposti ad eradicazione per 1 settimana con uno dei seguenti schemi; 1° gruppo: Omeprazolo (O) 20 mg + Amoxicillina (A) 1 gr + Claritromicina (C) 500 mg bid (OAC, 371 paz); 2° gruppo: O 20 mg + A 1 gr + Metronidazolo (M) 500 mg bid (OAM, 67 paz); 3° gruppo: Ranitidina bismuto citrato 400 mg + A 1 gr + C 500 mg bid (RBC, 47 paz); 4° gruppo O 20 mg + A 1 gr oppure C 500 mg bid per 2 settimane (Duplice, 27 paz). A 3 mesi dalla terapia, i pazienti sono stati sottoposti all'UBT, con dosaggio nell'esperto, (analizzatore ad Infrarossi), della 13-CO₂ prima e dopo 30 min dalla somministrazione di 200 ml di succo d'arancia contenente 75 mg di urea C-13. **Risultati:** sono stati considerati positivi i valori di delta over baseline (DOB) di 13-CO₂ superiori al 4 per mille, riportando le seguenti percentuali di eradicazione: 1° Gruppo OAC: 292/371= 78.5%; 2° gruppo OAM 52/67=78%; 3° gruppo RBC 36/47 80%; 4° gruppo Duplice 13/27 =48%. Dei 119 soggetti non eradicati, solo 44 appartenenti ai gruppi OAC e OAM, sono stati sottoposti ad un secondo trattamento, sostituendo C con M nello schema OAM e M con C nello schema OAC. I 44 pazienti così ritrattati per 1 settimana, hanno eseguito dopo 3 mesi un secondo controllo UBT, con una eradicazione complessiva dell'86% (38/44). **Conclusioni:** la percentuale in 1^a eradicazione in 3 dei 4 schemi proposti è soddisfacente e congrua con la corrente letteratura; il ritrattamento a schemi incrociati con C e M è una valida alternativa terapeutica nel caso di fallita 1^a eradicazione. L'UBT è un test diagnostico non invasivo di facile applicazione e di prima scelta nella valutazione dell'avvenuta eradicazione dopo terapia antibiotica.

G067

Magnani B., Rondanelli M., Zorzetto E., Migliavacca A., Bonora C.

INDICATORI BIOCHIMICI DELLO STATO NUTRIZIONALE IN UN CAMPIONE DI ANZIANI ISTITUZIONALIZZATI CON DEMENZA SENILE.

Istituzioni Assistenziali Riunite – Pavia, Italy

L'assessment nutrizionale nell'individuo anziano è ormai ritenuto d'obbligo alla luce dei nuovi risultati ottenuti dalla geriatria preventiva che hanno chiaramente dimostrato come un controllo adeguato, specialmente negli anziani istituzionalizzati, sia di gran lunga il protocollo terapeutico e preventivo più determinante nello stato di salute, dello stato funzionale e della guarigione di questi soggetti. Nonostante ciò, comunque, specialmente nelle strutture per anziani lungodegenti cronici, il problema è spesso sottovalutato o addirittura trascurato, molto spesso anche a causa di scarsa informazione o a causa dell'assenza di linee guida decisionali di indirizzo. Il supporto del laboratorio in questo aspetto è senz'altro indispensabile giacché consente un monitoraggio affidabile di marcatori sieroproteici dello stato nutrizionale, che spesso rientrano nella batteria dei tests biochimici svolti routinariamente. Durante la valutazione dello stato nutrizionale e di un protocollo decisionale di intervento dieto – terapeutico mirato, in pazienti affetti da demenza senile tipo Alzheimer accolti in un nucleo protetto, predisposto all'interno della RSA "F. Pertusati", abbiamo effettuato un'analisi statistica di correlazione tra alcuni parametri ematochimici e lo stato cognitivo, comportamentale ed il grado di autonomia di ciascun soggetto, allo scopo di valutarne l'eventuale reciproca influenzabilità. Pertanto, nel periodo gennaio 1999 – gennaio 2000, 18 soggetti anziani (2 maschi e 16 femmine) di età media di 85 ± 5 anni sono stati sottoposti ad una valutazione multidimensionale comprensiva di anamnesi patologica, ponderale, antropometrica ed impedenzometrica complete, esami biochimici (Hb, ematocrito, linfociti totali, proteine totali, albumina, prealbumina, transferrina, TIBC, creatininemia, azotemia, amilasi, trigliceridi, colesterolo totale, HDL, Apo A e B, Na, K, Cl, Ca, glicemia, HB glicata, fruttosammina, TSH, FT3, FT4, vit B12 e ac. Folico), ed a tests di screening per la valutazione della malnutrizione, dell'intake giornaliero e del rapporto con il cibo, oltreché ad una valutazione dello stato cognitivo – comportamentale. I risultati hanno confermato il valore prognostico per lo stato nutrizionale di molti parametri biochimici dosati ed una significativa correlazione positiva tra gli stessi ed i tests di valutazione dello stato cognitivo, comportamentale e funzionale. Questi risultati ci permettono di concludere sottolineando quanto il miglioramento dello stato nutrizionale, evidenziato dagli esami biochimici, sia influenzato e chiaramente influenzato, l'incremento delle capacità funzionali.

G068

Magnani B., Migliavacca A.°, Bonora C.°, Rondanelli M., Vitali B.

LA DISTRIBUZIONE DELLA LP(a) IN UN CAMPIONE DI ANZIANI FRAGILI

Istituzioni Assistenziali Riunite – Pavia, Italy.

L'anziano fragile è così definito a causa della condizione particolare che si accompagna al quadro pluripatologico e di compromissione funzionale fisiologico e cognitivo. Giacché è ormai noto da tempo che la Lipoproteina (a) è un fattore di rischio indipendente per le malattie ad eziopatogenesi cardiovascolare già a bassi livelli ematici nella popolazione adulta, e sebbene sia altresì noto che la sua concentrazione ematica è geneticamente predeterminata, non è influenzata dalla alimentazione o da altri fattori predisponenti, con questo lavoro ci si pone l'obiettivo di studiarne la distribuzione ed il peso, eventualmente giocato da questa lipoproteina, in una popolazione di anziani fragili istituzionalizzati.

La concentrazione ematica della Lp(a) è stata determinata con il metodo turbidimetrico (Turbitime Dade Behring), in un campione composto da 50 soggetti (20 maschi e 30 femmine) con età media di 82.15 ± 6.7 anni, range: 62-95, skewness 0.1 e ricoverati per un periodo dai 30 ai 90 giorni di riabilitazione in un istituto geriatrico. Tali valori sono stati posti in correlazione con i parametri biochimici routinariamente dosati per la valutazione dell'assessment generale del paziente (quadro lipidico, transaminasi, emocromo completo, parametri della coagulazione, amilasi, colinesterasi, creatinina, fibrinogeno, azotemia, elettroliti, alfa, beta e gamma proteine e proteine totali), con il numero e la tipologia di patologia diagnosticata e con il punteggio ottenuto dal Test di Barthel, scala largamente utilizzata in geriatria per l'inquadramento delle funzionalità fisiologiche dell'anziano.

Anche in questo campione di individui anziani, la distribuzione della Lp(a) è concorde a quanto si riscontra in bibliografia: media $20.67 \text{ mg/dL} \pm 18.43$, range: 0- 83, skewness 1.58, senza differenze statisticamente significative tra i due sessi.

La concentrazione ematica della Lp(a) non è associata a nessuno dei parametri biochimici indagati, né ad alcuna patologia in particolare né alla pluripatologia, o al punteggio del test di Barthel. Questi risultati e l'assenza di associazione tra la Lp(a) e le patologie cardiovascolari insorte in tarda età come esito di compromissioni fisiologiche-organiche generali, e l'associazione con quelle cardiovascolari su base ereditaria ($p=0.02$), confermano l'indipendenza di questo fattore di rischio anche nella popolazione fragile anziana.

Altinier S.*, Mion M.*, Zaninotto M.*, Cappelletti A.*, Plebani M.*, Rocco S.***, Adam M.***, Tosato F.**

DOSAGGIO DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI DANNO MIOCARDICO CON SISTEMI POINT-OF-CARE: RISULTATI DI UNA ESPERIENZA

*Servizio di Medicina di Laboratorio, **Servizio di Pronto Soccorso, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova (Italy)

Nel corso di un'esperienza durata cinque mesi, è stato verificato l'impatto dell'introduzione di sistemi point-of-care per il dosaggio dei marcatori cardiaci in un Pronto Soccorso generale, introducendo in tempi successivi due sistemi (A: Stratus CS, Dade-Behring e B: Triage Cardiac Panel, Biosite Diagnostics) che consentono la determinazione quantitativa di CK-MB, mioglobina (myo) e troponina I (TnI) direttamente da sangue intero. In accordo col protocollo per la valutazione del paziente con dolore toracico da tempo in uso presso il nostro ospedale, in questo studio sono state valutate myo e TnI. I risultati ottenuti dimostrano che:

-l'efficienza in termini di imprecisione che consente il raggiungimento del goal analitico per la TnI in entrambi i sistemi (CV A=5.01%, CV B= 8.31%) ma non per la mioglobina (CV A=3.73% e CV B=11.6%) non è sufficiente a garantire un utilizzo ottimale di tali sistemi in condizioni d'emergenza. Infatti, la mancanza di confrontabilità dei dati con quelli dello strumento principale del laboratorio (Rxl Dimension, Dade-Behring), del sistema B, (myo $r=0.681$; slope=0.514, $Sy/x=9.31$, TnI $r=0.92$, slope 0.54; $Sy/x=2.13$) ha determinato un ricovero inappropriato (medicina vs unità di cure intensive) nel 5% dei pazienti considerati;

- il tempo di risposta risulta significativamente diminuito avendo rilevato durante l'utilizzo dei POCT un tempo totale di risposta (dal ricovero in PS alla disponibilità del risultato) pari a 45 min (75°percentile), rispetto al tempo totale dell'attuale sistema organizzativo pari a 101.75 min (75°percentile): 40 minuti relativi alla fase preanalitica, dal prelievo all'arrivo in laboratorio, e 61.75 alla fase analitica e di trasmissione elettronica del risultato;

-riduzione dei tempi di rule out, in quanto precedente all'ottenimento di altri risultati dal laboratorio d'urgenza, in alcuni pazienti (5%) con dolore toracico ma ECG non significativo e concentrazioni normali di marcatori cardiaci

-le principali caratteristiche di un sistema POCT, secondo quanto emerso da un questionario distribuito a tutto il personale del Pronto Soccorso alla fine dello studio, sono rappresentate da facilità di utilizzo con ridotte manutenzioni (100%), confrontabilità di risultati (preferibilmente quantitativi) con quelli di routine (91%), sicurezza per l'operatore (82%), possibilità di scelta di test in base al tempo preconarico e al paziente (73%).

Faccini G., Girelli D., Pizzolo F., Olivieri O., Stranieri C., Russo C., Martinelli N., Zaia B., Zenari M.L., Gerani C., Bertozzo L., Pignatti P.F., Corrocher R.

GENETIC AND ENVIRONMENTAL DETERMINANTS OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN SUBJECTS WITH ANGIOGRAPHICALLY PROVEN CORONARY ARTERY DISEASE.

Istituti di Chimica Clinica, Medicina Interna e Biologia e Genetica, Università di Verona, Policlinico GB Rossi, 37134 Verona.

Mild to moderate hyperhomocysteinemia has been associated to coronary artery disease (CAD), though a causal role is still to be proved. We studied 609 subjects, 395 with angiographically documented CAD, 214 with documented normal coronary arteries. Plasma total homocysteine (tHcy) was measured by HPLC with fluorescent detection, and the thermolabile variant of the Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) enzyme (i.e. the C₆₇₇T polymorphism) was determined by PCR and HinfI digestion, as previously described¹. Fasting tHcy was increased in CAD vs. CAD-free (16.3 $\mu\text{mol/l}$ vs. 14.9 $\mu\text{mol/l}$, respectively; $P<0.01$). Moreover, hyperhomocysteinemia (defined as fasting Hcy and/or post-methionine loading Hcy in the highest quartile of the control distribution) was more frequent in CAD vs. CAD-free (43% vs. 32.6%; $P=0.01$). We found a strong and graded gene-environmental interaction between MTHFR C₆₇₇T polymorphism and folate status as determinants of fasting tHcy levels. The highest tHcy levels were found in TT subjects with folate levels below the 50th percentile (24.8 $\mu\text{mol/l}$), in CT subjects with folate levels below the 25th percentile (18.7 $\mu\text{mol/l}$), and in CC subjects with folate levels below the 10th percentile (16.9 $\mu\text{mol/l}$), respectively. Altogether, these 3 categories were more represented in CAD vs. CAD-free (30.2% vs. 21.2%; $P=0.018$; OR = 1.6; 95% confidence interval 1.1 to 2.4). Our results suggest that subjects with different MTHFR C₆₇₇T genotype may require different folate intake to maintain tHcy levels in a safe range.

1. Girelli D et al. Blood 1998; 11:4158-4163.

G071

Auriemma L., Moscheni C., *Signorelli S., Ubiali G., Panna A., Nicoli D.

IL DOLORE TORACICO: NOSTRA ESPERIENZA

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Bolognini, Seriate (BG); *Gastroenterologia, OORR, Bergamo.

Il dolore toracico è un sintomo frequentemente lamentato dai pazienti e di non univoca interpretazione. Fondamentale è distinguere nel più breve tempo fra le condizioni potenzialmente letali, come l'infarto miocardico acuto (IMA), la dissezione dell'aorta, l'embolia polmonare e quelle meno aggressive, come l'esofagite da reflusso, la pleurite, l'emotività, i dolori neuromuscolari. Scopo del nostro lavoro è stata la verifica dell'impatto del dolore toracico fra le altre patologie che afferivano al Pronto Soccorso (PS) del nostro Ospedale e la prevalenza della patologia cardiaca. Metodi Tra i 15265 soggetti che per 5 mesi sono giunti al PS per una patologia acuta, sono stati studiati tutti i pazienti con dolore toracico rilevando su una scheda i dati anagrafici, le caratteristiche del dolore, il tempo di insorgenza, la durata dei sintomi, l'esame obiettivo, lo stato cardiovascolare e l'ECG. Sono stati dosati inoltre gli enzimi cardiaci tradizionali di necrosi (CPK, CPK-MBmassa, LDH, AST), la Mioglobina, proteina sensibile, ma non cardiospecifica (valore predittivo negativo 97%) dosata dopo almeno 2.30 ore dal dolore e monitorata fino a 12 ore dal dolore, la Troponina I cardiospecifica, dosata non prima di 5-6 ore dall'insorgenza del dolore e fino a 4-5 giorni dopo. I dosaggi di Mioglobina e Troponina I sono stati eseguiti con strumento Access in chemiluminescenza adottando per Mioglobina valori di normalità fino a 70 ng/ml e per Troponina I valori fino a 0.05 ng/ml; valori di Troponina I tra 0.05 ng/ml e 1.0 ng/ml sono stati definiti di "attenzione" e positivi quelli sopra lo 0.1 ng/ml. Risultati: 580/15265 (3,8%) degli accessi in PS in 5 mesi sono imputabili al dolore toracico; 185/580 (32%) presentavano una patologia coronaropatica e precisamente: 55 IMA, 78 Angina pectoris, 52 ischemia e/o necrosi parcellare. Di contro 395/588 (68%) dei soggetti con dolore toracico presentavano negatività all'ECG, enzimi di necrosi tradizionali, mioglobina e troponina I adeguatamente monitorate nel tempo. Conclusioni Nella nostra esperienza circa un terzo dei pazienti giunti all'osservazione al nostro PS con dolore toracico riconosce un'origine coronaropatica del dolore e di questi 55/185 (29%) un IMA; gli altri due terzi dei soggetti giunti all'osservazione per dolore toracico presentano invece una patologia presumibilmente non cardiaca.

G072

Pagani F.¹, Turla C.², Bonetti G.¹, Bonini E.², Cuccia C.², Panteghini M.¹

LA TROPONINA I NELL'EMBOLIA POLMONARE ACUTA: UN NUOVO INDICATORE DI GRAVITÀ?

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1 e ²Cattedra e Divisione di Cardiologia, Università degli Studi e Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

La troponina I cardiaca (cTnI) è un indicatore biochimico molto specifico di danno miocardico ed il suo utilizzo nei pazienti con sindromi coronariche acute è ormai ben definito.

In questo lavoro, è stato valutato il rapporto tra il livello di positività della cTnI e la gravità dell'embolia polmonare (EP), ipotizzando che ad un più severo sovraccarico ventricolare destro si possa accompagnare un più evidente danno miocardico.

Sono stati studiati prospetticamente 26 pazienti consecutivi con EP confermata con scintigrafia ad alta probabilità. Le EP sono state suddivise in massive (esteso difetto perfusorio alla scintigrafia e segni ecocardiografici di ipertensione polmonare) emodinamicamente stabili (gruppo A) o instabili (frequenza cardiaca >120 b/min, pressione arteriosa <90 mmHg) (gruppo B) e submassive (discreto difetto perfusorio senza segni ecocardiografici di ipertensione polmonare) (gruppo C). In tutti i pazienti è stata dosata la cTnI (metodo Bayer ACS:180) all'ingresso in Unità di Cura Coronarica, e a 6 e 12 ore. Essendo i valori in concentrazione di tale marcatore metodo-dipendenti, i risultati ottenuti sono stati relativizzati alla concentrazione corrispondente al cutoff decisionale per il danno miocardico (0.20 µg/L) ed espressi in Volte x Cutoff (VxC). Nei 7 pazienti con EP massiva clinicamente instabile (B), i valori di cTnI al picco sono risultati sempre elevati (mediana 7.3 VxC, intervallo 3.0-10.0). Nei 14 pazienti con EP massiva in assenza di shock (A) sono stati ottenuti valori di cTnI intermedi (mediana 1.7 VxC, intervallo 0.6-2.6), con 12 pazienti positivi su 14 (86%). Nei 5 pazienti con EP non massiva (C), tutti i valori di cTnI sono risultati negativi (mediana 0.35 VxC, intervallo 0.2-0.6). Classificando i pazienti sulla base dei dati clinici e strumentali ("score" clinico da 1 a 16), si è evidenziata una relazione altamente significativa (P <0.001) tra il valore di "score" e le concentrazioni di cTnI (r² = 0.59).

In conclusione, i nostri dati sembrano indicare un possibile ruolo della cTnI nel riconoscimento di pazienti con EP a più grave impegno emodinamico. Qualora questi risultati fossero confermati in una più ampia casistica, la determinazione della cTnI potrebbe essere proposta al fine di identificare quei pazienti con EP che necessitano di un approccio terapeutico più aggressivo.

G073

Morelli B.*, Grassi C.*, Lazzati L.*, Passoni F.°, Seveso G.°, Beria G.°, D'Urbano M.°, Cafiero F.°, De Servi S.°

SHORT-TERM PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF COAGULATION AND INFLAMMATION MARKERS IN UNSTABLE ANGINA

*Laboratorio di Ematologia, °U.O. Cardiologia, Azienda Ospedaliera Ospedale di Legnano, Legnano (MI)

Background: Activation of the coagulation system and inflammation are frequently associated with unstable angina presentation. The purpose of this study was to identify coagulative and inflammatory markers that would predict an unfavourable outcome in unstable angina patients.

Methods: Fifty-eights patients admitted to the CCU for Braunwald Class III of unstable angina had blood samples taken on admission and day 3. The following parameters were measured: interleukin-6 (IL-6), von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag), thrombomodulin (TM.), prothrombin fragment 1+2 (F1+2), thrombin-antithrombin complexes (TAT). At 30 days, 39 patients had an uneventful clinical course (group I) while 19 patients (group) either died (n=4) or had recurrent angina or myocardial infarction (n=15).

Results (mean ± SD):

	Group I (n=39) Admission Day 3		Group II (n=19) Admission Day 3	
	IL-6	7,2 ± 6,7	5,9± 9,1	5,2 ± 5,4
VwF:Ag	112 ± 28	119± 17	117 ± 13	119± 12
TM	42,5 ± 37	47,5 ± 30	41,5 ± 31	55± 40
F1+2	1,39± 0,78	1,46± 0,5	1,28 ± 0,5	1,45± 0,57
TAT	5,45 ± 8,40	4,59 ± 4,98	4,68 ± 2,3	5,02 ± 1,69

*p<0,05 day 3 versus admission.

In conclusion: No difference was found in the baseline values of coagulative and inflammatory markers between patients with or without an unfavourable 30-day outcome. Rising interleukin-6 values were the only prognostic indicator, suggesting that a mounting inflammatory process is associated with a worse short-term outcome.

Reference: Fuster V, Badimon L, et al : "The pathogenesis of the coronary artery disease and the artery coronary syndromes", N. Engl. J. Med., 1992, 242-50, 310-18

G074

Morelli B.*, Grassi C.*, Lazzati L.*, Spaziani D.°, Seveso G.°, Beria G.°, D'Urbano M.°, Cafiero F.°, De Servi S.°

DIFFERENT INFLAMMATORY RESPONSE AFTER STENT IMPLANTATION IN UNSTABLE ANGINA VERSUS STABLE ANGINA

*Laboratorio di Ematologia, °U.O. Cardiologia, Azienda Ospedaliera Ospedale di Legnano, Legnano (MI)

Background: Plasma levels of cytochines and inflammatory mediators are frequently increased in acute ischemic syndromes, yet their time course after succesful percutaneous transluminal coronary angioplastic (PTCA) is unknown. The purpose of this study was to compare changes of interleukin IL-6, an index of inflammation, and von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag), an index of endothelial activation, after succesful PTCA with stent implantation in patients with unstable (UA) and stable angina (SA).

Methods: Thirty-one patient (23 mens, 8 women, mean age 69 years, range 49-88) had unstable angina, defined as angina at rest, Braunwald Class IIB-IIIIB or IIC-IIIC (UA group); 21 patients (19 men, 2 women, mean age 58 years, range 50-76) had stable angina, defined as exercise-induced chest pain with positive exercise stress test (SA group). All patients underwent succesful PTCA of 1 vessel, followed by stent implantation. Plasma levels of interleukin-6 (IL-6) and von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag) were measured by ELISA technique prior to PTCA, 24 hours after PTCA and 30 days thereafter.

Results:

	Pre-PTCA		24 h post-PTCA		30-d post-PTCA	
	UA	SA	UA	SA	UA	SA
IL-6	7.1± 7.4*	2.9± 3.6	7.5± 6.5	5.0 ± 6.6	2.9± 3.18§	3.2 ± 3.5°
vWF:Ag	120 ± 38	104 ± 40	127 ± 28	107 ± 23	107± 20§	108 ± 15

*p=0,02 pre-PTCA UA versus pre-PTCA SA; §p < 0,005 30-d UA versus pre-PTCA UA; °p=0,005 30-d SA versus pre-PTCA SA.

In conclusion: Although plasma baseline levels of IL-6 are higher in unstable patients than in stable angina patients, they equalize 30 days after a succesful PTCA followed by stent implantation. A similar trend is observed for vWF:Ag changes. IL-6 levels increase early after PTCA in stable angina patients, but not in unstable angina patients: it is likely that in the latter group, the inflammatory reaction induced by the procedure is counterbalanced by the remotion of the cause of the raised baseline levels (unstable plaque).

Reference: Fanelli C, Aronoff: "Restenosis following coronary angioplasty", Am. Heart J., 1990, 134, 357-368