
ABSTRACT POSTER

Poster - Mercoledì 13 settembre 2000

M001 - M006	Applicazioni informatiche
M007 - M017	Automazione, tecniche analitiche
M019 - M034	Biologia molecolare
M035 - M045	Coagulazione
M046 - M053	Controllo di qualità
M054 - M067	Ematologia, emoglobine
M068 - M080	Endocrinologia, ormoni
M081 - M087	Enzimi, isoenzimi
M088 - M091	Esame standard dell'urina
M092 - M108	Farmacologia e tossicologia
M109 - M113	Gestione, qualità totale
M114 - M122	HPLC, tecniche separative

Poster - Giovedì 14 settembre 2000

G001 - G015	Immunologia, immunometria
G016 - G020	Interferenze
G021 - G027	Lipidi, lipoproteine
G029 - G040	Marcatori tumorali
G041 - G043	Metabolismo e metalli
G044 - G061	Proteine
G062 - G065	Screening pre/neo-natali Storia della chimica clinica
G066 - G090	Studi clinici
G091 - G114	Valutazione di strumenti e prodotti

M001

Roli S., De Biase U., Costa L., Grusi R., Negri P.

RILEVAZIONE STATISTICA DEI CONSUMI ASSOCIATA AL CONTROLLO DI GESTIONE: ESPERIENZE DI UTILIZZAZIONE DI UN FOGLIO ELETTRONICO COMPILATO IN MICROSOFT EXCEL

Servizio di Patologia Clinica P.O. "Carlo Poma"
Azienda Ospedaliera "Ospedale Carlo Poma"
Viale Albertoni, 1 – 46100 Mantova

Il mutato ruolo del dirigente nel nuovo assetto del servizio sanitario pubblico impone nuove competenze di natura gestionale.

Tale esigenza si scontra con la scarsa esperienza e preparazione specifica e con la povertà di strumenti operativi a disposizione per poter far fronte alle esigenze di natura gestionale.

E' tuttavia possibile che uno strumento di semplice utilizzo e di facile applicazione quale un foglio elettronico compilato in Microsoft Excel, possa trasformare la banale ed abitudinaria rilevazione dei consumi o delle prestazioni di ogni settore del Laboratorio in un momento di previsione e di verifica gestionale.

Gli autori hanno predisposto un file di Microsoft Excel formato da più fogli, destinati alla rilevazione statistica mensile (1 foglio per ciascun mese), 1 foglio di riepilogo cumulativo, 1 foglio contenente le caratteristiche dei materiali diagnostici utilizzati per ogni singola prestazione contenente le modalità tecniche dei dosaggi, la pezzatura ed i costi dei kit commerciali utilizzati, 1 foglio riepilogativo dei costi così determinati ed 1 foglio riassuntivo di bilancio per fornitore e per strumentazione e/o subarticolazione di settore.

Il foglio elettronico utilizza una serie relativamente complessa di formule matematiche che sono state impostate prima dell'avvio del sistema di rilevazione ma modificabili od implementabili anche in corso di applicazione.

Il sistema, una volta avviato, richiede come unico intervento dell'utilizzatore, l'inserimento dei dati relativi al consumo (od al numero di prestazioni erogate) giornaliero per esame.

Il metodo di rilevazione è adottato dal mese di gennaio 2000 e, dalla data della sua attivazione, rende automaticamente disponibili in tempo reale dati consuntivi e di previsione per l'anno di rilevazione:

- Consumi (per prestazione) e numero di prestazioni
- Costi analitici di produzione (per prestazione e globali) scomposti (e percentualizzati) per incidenza di reagente, calibrazione, materiale di controllo, materiale accessorio, spese di personale, spese generali, ecc.
- Bilancio economico per prestazione (per raffronto con le tariffe previste dal tariffario vigente)
- Bilancio per fornitore e/o subarticolazione

Tali rilevazioni si sono dimostrate di grande utilità al fine di una corretta valutazione ed ottimizzazione dell'organizzazione del servizio.

M002

Moretti B., Lavolpe V., Amati A., Zoccolella S., Genco S., Fraddosio A., Serlenga L., Lamberti P.

APPLICAZIONE MEDIANTE PC DELL'ANALISI DELL'IMMAGINE PER LA VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELL'ATROFIA DA LESIONE O DA IMMOBILIZZAZIONE DEL LEGAMENTO CROCIATO ANTERIORE.

Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche
Facoltà di Medicina e Chirurgia-Policlinico-Bari.

Obiettivi dello studio:

Obiettivo di questo studio è stabilire se l'atrofia muscolare del quadricipite nella patologia del ginocchio è secondario alla lesione dell'articolazione in questo caso dell'LCA, o se essa dipende dal periodo più o meno prolungato di immobilizzazione cui l'arto è sottoposto nelle terapie di tali patologie. Si è visto se tale processo di atrofia muscolare interessa selettivamente un ventre muscolare o all'interno di esso un tipo specifico di fibre muscolari.

Materiali e Metodi:

Sono stati esaminati 35 ratti di razza Winstar. Gli animali sono stati divisi in 3 gruppi. Un primo gruppo di 15 animali sono stati sottoposti ad immobilizzazione in estensione dell'arto posteriore destro mediante gesso. Un secondo gruppo sempre di 15 animali è stato sottoposto a lesione del legamento crociato anteriore dell'arto posteriore destro e poi lo stesso è stato lasciato libero. Infine un terzo gruppo di 5 animali ha costituito il controllo. Nei primi due gruppi di ratti sono stati effettuati prelievi biotipici del vasto mediale, del vasto laterale ed del retto femorale a 7, 14 e 28 giorni di distanza dall'intervento. Sono state tagliate al criostato sezioni seriate di 8 μ , colorate, ed i risultati morfometrici sono stati ricavati mediante la tecnica computerizzata dell'Analisi dell'Immagine.

Risultati e Conclusioni:

Raggruppando le fibre muscolari di ratto in classi con \emptyset progressivamente crescente di 10 μ , è stato ricavato un istogramma di distribuzione di tali fibre e da questo è stata calcolata la percentuale delle varie classi e i fattori di atrofia. Sono risultate statisticamente significative le differenze rispetto ai controlli sia per quanto concerne il fattore di atrofia che la distribuzione delle varie classi. Si conclude che il vasto mediale è più sensibile ai danni da lesione del LCA (28% di atrofia in 1^a settimana e 30% in 2^a settimana rispetto ad un 24% in 1^a e 27% in 2^a dei ratti trattati con immobilizzazione. Il vasto laterale è più sensibile ai danni da immobilizzazione 43% in 1^a, 44% in 2^a e 49% in 4^a settimana rispetto alla lesione ed in maniera più prolungata nel tempo.

Bibliografia:

Veldhuizen JW, Verstappen FT, Vroemen JP, Kuipers H, Greep JM. Functional and morphological adaptations following four weeks of knee immobilization. *Int J Sports Med.* 1993 Jul;14(5):283-7.

M003

Iorio P., Scarselli E., Rossi F*, Delvecchio C.

PROGETTAZIONE, COSTRUZIONE ED USO DI UN SITO WEB PER UN LABORATORIO PUBBLICO DI ANALISI CHIMICO CLINICHE

Laboratorio Analisi Ospedale Bufalini AUSL Cesena. Viale Ghirotti 256 47023 Cesena (FC). *Facoltà di Informatica. Università degli Studi di Bologna sede di Cesena.

Internet è utile al laboratorio di chimica clinica come fonte di informazione; può essere utile al laboratorio come strumento per fornire informazione? L'esperienza descritta in questo studio dice di sì. Descriveremo le tappe della realizzazione del sito Web del laboratorio di analisi chimico cliniche della A.U.S.L. di Cesena (<http://www.ausl-cesena.emr.it/AUSLCesena/LabAnalisi/index.htm>).

1) Definizione e verifica degli obiettivi. 2) Progettazione del sito e reperimento delle risorse. 3) Costruzione del sito. 4) Manutenzione e miglioramento.

1) Definizione degli obiettivi: individuazione con la direzione del laboratorio degli scopi del sito web: 1a) fornire informazioni agli utenti sul servizio offerto godendo di tutti i vantaggi dei documenti ipertestuali (navigazione guidata) e della proiezione su una "bacheca" così potente come il World Wide Web 1b) raggiungere tramite internet gli addetti ai lavori presenti sul Web per avere da loro stimoli costruttivi 1c) interagire con utenti e colleghi attraverso un canale istituzionale di qualità (molte sono in internet le fonti informative sugli esami di laboratorio, poche tuttavia possono garantire all'utente la qualità di un laboratorio pubblico, per definizione al suo servizio). La definizione della condivisione degli obiettivi da parte degli utenti e colleghi è stata fatta tramite un questionario. 2) Progettazione del sito: studio dei siti di laboratorio già esistenti, definizione di un progetto molto sintetico e delle risorse tecniche ed umane necessarie. Individuazione del personale del laboratorio da dedicare al progetto, inizio di collaborazione con la facoltà di informatica Università di Cesena. 3) Costruzione del sito : creazione dei file, simulazione del funzionamento, installazione sul server del provider, verifica del funzionamento, notificazione ai motori di ricerca. 4) Manutenzione e miglioramento: definizione di procedure per mantenere aggiornate le informazioni diffuse; inizio costruzione motore di ricerca su database relativo ai servizi offerti dal laboratorio; implementazione del servizio anche sulla rete intranet.

Bibliografia: R. Peters, R. Sikorski. JAMA October 21, 1998, 1365-1366.

M004

Lavarda F.°, Cipani S.°, Di Mauro P.*, Petrini C.°

IMPLEMENTAZIONE INFORMATICA DEL CONTROLLO STATISTICO DI QUALITÀ

°Laboratorio di Biochimica - Azienda Ospedaliera Ospedale S. Carlo Borromeo Via Pio II,3 20100 Milano

*Omnilab srl Via Soperga,4 20127 Milano

Il laboratorio analisi chimico-cliniche in questo periodo si sta confrontando con le problematiche relative alla certificazione e all'accreditamento. Tra le tante adempienze che devono essere messe in atto per soddisfare i requisiti del sistema qualità, una parte centrale è riservata al controllo statistico di qualità. Tale controllo deve dimostrare che gli standard di prodotto/servizio, legati alla precisione e all'accuratezza dei test eseguiti in laboratorio, sono rispettati e documentati. In un laboratorio analisi sono molti i materiali di controllo utilizzati e molti i test sottoposti a controllo statistico di qualità, il che rende tale attività molto onerosa. Nel nostro laboratorio per poter rendere ciò meno oneroso, ma efficiente ed efficace, abbiamo implementato un sistema di controllo statistico di qualità completamente informatizzato. Le specifiche prioritarie poste per questo sistema sono state: acquisizione automatica dei risultati dei controlli nel programma statistico di controllo di qualità, tracciabilità dei risultati, verifica in real time degli indici statistici del controllo di qualità, indipendenza del sistema rispetto al fornitore di materiali di controllo. Le fasi di implementazione del sistema sono state: 1) la parametrizzazione dei materiali di controllo sul server del laboratorio, sugli analizzatori e sul programma statistico di controllo di qualità (sono stati utilizzati 3 diversi programmi: OQCS ditta Ortho, UNITY ditta Biorad e MedlabQC di Philippe Marquis Metz Francia); 2) scrittura di un programma da aggiungere al driver dei PC che controllano gli analizzatori, per intercettare i risultati dei controlli eseguiti sugli strumenti e inviarli da una parte al server gestionale e dall'altra ai 3 programmi di controllo statistico di qualità. La scrittura di tale programma è critica per l'intero sistema e garantisce l'indipendenza dal fornitore dei sieri di controllo e conseguentemente dai relativi programmi di controllo statistico di qualità. I risultati vengono inviati via rete utilizzando un normale file di dati e, nel caso del programma MedlabQC, facendo uso di un'interfaccia COM. I materiali di controllo attualmente utilizzati sono 40 e i test analitici sottoposti a controllo sono 117 e gli strumenti 10. Tutte le varie fasi di parametrizzazione e di controllo del sistema sono state documentate secondo le norme ISO 9000.

M005

Baudino G., Carrara N., Garro C., Mondino M.R., Pianezza D., Bracco G.

LA FLESSIBILE ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO (OVVERO L'ABOLIZIONE DEI PALETTI DI DIFESA DEL FORTINO)

Lab. Analisi- Az. Osp. S. Croce e Carle – CN

Tempi di esecuzione degli esami, riduzione dei costi, controllo di qualità nella fornitura del prodotto, funzionalità delle strutture sanitarie nell'ospedale moderno pongono quesiti organizzativi.

La identificazione e la rintracciabilità dei campioni ha sempre posto problemi, nell'ambito sia di sistemi manuali sia di sistemi informatizzati.

Le soluzioni sono sovente state inficiate dalla complessità dei software, e dalle difficoltà di interfacciamento con altri sistemi informatici.

Obiettivo è ottimizzare l'utilizzo del codice a barre per controllare tutte le fasi del processo, riducendo l'intervento umano, e consentendo maggiore flessibilità in accettazione (orari e tipologia di analisi).

Sono stati utilizzati:

- schede ottiche di richiesta con codice a barre (Reggiani, Milano);
- lettura ottica automatizzata delle richieste (Metafora, Milano);
- sorting manuale e/o automatico con check-in dei campioni (programma Garro, sorte PSD Roche);
- trasmissione dell'86% delle analisi (Metafora, Milano);
- archiviazione memorizzata dei campioni processati (Garro, Cuneo).

Sono presenti profili diagnostici concordati con ogni Reparto. Routine e urgenza seguono esattamente gli stessi flussi di lavoro, con priorità per le emergenze. Non esiste limite di orario per l'accettazione di routine ed urgenza. Tolti i paletti di difesa del fortino, nel fortino si lavora meglio e gli utilizzatori paiono più soddisfatti, a tutto vantaggio del malato.

La risoluzione dei problemi inizia con una attenta analisi dei flussi di lavoro.

Si è osservata una riduzione dei tempi di esecuzione, ed una diminuzione dei tempi di reperimento dei campioni.

La netta riduzione del numero di segnalazioni da parte dei Reparti di ritardi nelle risposte di analisi urgenti e routinarie ha confermato il miglioramento delle performance globali.

M006

Ognibene A., Mannucci E.*, Parretti E.°, Rotella C.M.*, Mello G.° and Messeri G.

LABORATORY DATA MINING AND NEURAL NETWORKS: EFFECTIVE TOOLS FOR THE EVIDENCE BASED MEDICINE

Laboratorio di Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera Careggi; *Dipartimento di Fisiopatologia, Sezione di Malattie Metaboliche e Diabetologia, °Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università di Firenze;

Data mining is an inductive process that uses a variety of data analysis tools to discover patterns and relationships in data that be used to make valid prediction. The term comes from the world of retail and finance. Generally, data mining works on the premise that you will collect a massive amount of data and than look for patterns in the data. Disease management, performance measurement, evidence-based medicine, and other data-driven processes continue to descend on the health care system. Massive and noisy clinical laboratory data lay in the lab archive and represent a "mine" which can be use for purposes sometimes different from those who generated the request. During the last years, artificial neural networks (aNN) were proposed as valid tool to discover patterns and relationships within large amount of data. As a possible application, we used aNN to analyse data stored in the lab archive and we proved the ability of simple lab tests coupled with few clinical information in detecting subjects likely to develop disease. To this purpose, a set of 28 laboratory and clinical variables were analysed to predict diagnosis of type 2 diabetes in a high-risk population (obese patients). The final model obtained was capable to reveal the disease with 92% sensitivity (60/65) and 74% specificity (105/142); 35% out of apparently false positive patients, after two years follow-up were found to be diabetic. In a second experiment, a set of baseline clinical and laboratory data collected at 20 weeks of gestation, was tested for the ability to predict the development of pregnancy induced hypertensive disorders (PIHD) in 303 normotensive pregnant women at high risk of developing preeclampsia. The aNN at 20 weeks yielded an 86.2% sensitivity and a 95.4% specificity.

M007

Iorio P., Miano A., Ambroni M., Pracucci A., Lughì L., Baldinini A., Delvecchio C.

MISURAZIONE DI CLORO, SODIO E POTASSIO NEL SUDORE CON UN ANALIZZATORE AUTOMATICO PER CHIMICA CLINICA

Laboratorio Analisi Ospedale Bufalini AUSL Cesena. Viale Ghirotti 256, 47023 Cesena (FC).

Misurare il Cl^- nel sudore è essenziale per la diagnosi di fibrosi cistica (F.C.). Metodo di riferimento NCCLS è la titolazione coulometrica. Tale metodo richiede strumentazione dedicata attualmente non disponibile sul mercato europeo. L'impiego di elettrodi ione-selettivi (ISE) dedicati è un metodo alternativo accreditato. Questo studio verifica la fattibilità della misurazione del Cl^- nel sudore col modulo ISE di un analizzatore automatico di chimica clinica (HITACHI 917R). Inoltre i risultati ottenuti sono stati confrontati col metodo colorimetrico manuale usato dal nostro laboratorio. La stimolazione della sudorazione è stata fatta con iontoforesi pilocarpinica secondo Gibson e Cooke. Raccolta sudore con spirale Macroduct. Misurazione Cl^- , Na e K con HITACHI 917 R calibrato con calibratori dedicati (ditta Roche) senza compensazione. Controllo di qualità con materiale commercializzato dalla ditta Wescor a concentrazione nota di Cl^- ottenuta con metodo di riferimento NCCLS. Per la misurazione colorimetrica del Cl^- sudore raccolto su carta bibula ed eluito manualmente. Per la reazione uso di reattivo commerciale. Misure eseguite in 42 soggetti (18 femmine e 24 maschi, età media 5 anni) dei quali 10 affetti da F.C. e 32 sani. Presenza/assenza di F.C. era ignota allo sperimentatore. Il sudore raccolto con la spirale macroduct è stato insufficiente per l'analisi con l'HITACHI 917 in 12 casi e sufficiente (>50 %) in 30 casi. In tutti i soggetti senza F.C. la concentrazione di Cl^- è risultata <30 mEq/l (media 10,9 d.s. 3,8 n=10) In tutti i soggetti con F.C. la concentrazione Cl^- è risultata >60 mEq/L (m=100.2±8.8 n=9). Interessanti i risultati della misurazione Na e K nei pazienti senza F.C. e con F.C. (media Na con F.C.=111,8, senza F.C.=23; media K con F.C.= 12,61, senza F.C.=11,5). Imprecisione analitica misura Cl^- intraassay pari a C.V. 0.6 alla conc. di 21 mEq/ e a C.V. 0.75 alla conc. di 43,9 mEq/l. C.V. interassay = 14.3 alla conc. di 21 mEq/ e 8.96 alla conc. di 43,9 mEq/l. Secondo il metodo di Bland ed Altmann i risultati ottenuti con l'Hitachi 917R appaiono in buona correlazione con quelli del metodo colorimetrico classico. In conclusione l'HITACHI 917 R può essere agevolmente usato per l'esecuzione automatica della misurazione del Cl^- nel sudore. Bibliografia. B.J. Rosenstein, G. B. Cutting. J. of Pediatrics 1998; 132: 589-595

M008

Boselli C., Morandi M., Bonetti G., Pagani F., Panteghini M.

IMPLEMENTAZIONE DEI METODI RACCOMANDATI IFCC PER LA DETERMINAZIONE DI 4 ENZIMI SU ANALIZZATORE ABBOTT AEROSSET

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

Scopo di questo lavoro è stato quello di implementare su una strumentazione completamente automatica recentemente commercializzata, l'analizzatore Abbott Aeroset™, i metodi raccomandati dalla Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) per la determinazione di quattro attività enzimatiche: alanina amminotransferasi (ALT), aspartato amminotransferasi (AST), fosfatasi alcalina (ALP) e γ -glutammina transferasi (GGT). Per confronto, tali metodi sono stati eseguiti manualmente utilizzando uno spettrofotometro Perkin Elmer, modello Lambda 2, alla temperatura di 37°C. Sono state seguite le indicazioni contenute nei documenti del "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) americano, relative alla valutazione della imprecisione (EP5-A) e alla comparazione fra metodi (EP9-A). In particolare, lo studio dell'imprecisione strumentale e' stato effettuato analizzando in doppio, per 10 sedute analitiche, due pool di sieri umani di attività pari al 75° percentile della distribuzione dei valori di riferimento e a circa 3-5 volte il limite superiore di riferimento del corrispondente enzima, ed il confronto fra metodi su 40 campioni di siero umano a varia attività. L'accettabilità dell'imprecisione si e' basata su criteri biologici (CB: ≤ 0.5 variabilità intraindividuale), storici (stato dell'arte del laboratorio: IQC) e sul confronto con i dati forniti dal produttore (vedi tabella seguente):

Enzima	Media	CV _{totale}	CB	IQC	Abbott
ALT	42 U/L	1.6%	12.2%	4.5%	4.6%
	126 U/L	2.2%	12.2%	-	3.8%
AST	31 U/L	2.9%	6.0%	2.2%	5.4%
	119 U/L	1.5%	6.0%	-	1.4%
ALP	66 U/L	1.7%	3.2%	1.9%	3.2%
	140 U/L	1.0%	3.2%	-	2.5%
GGT	51 U/L	1.0%	6.9%	1.4%	1.8%
	144 U/L	0.8%	6.9%	-	1.1%

Il confronto dei risultati del metodo automatizzato (y) con quelli ottenuti con il metodo di riferimento (x) ha fornito le seguenti correlazioni:

-per la ALT, $y = 0.92x - 0.3$, $r = 0.9999$, $Sy_x = 1.03$;

-per la AST, $y = 0.92x - 0.6$, $r = 0.9997$, $Sy_x = 1.14$;

-per la ALP, $y = 1.00x + 0.4$, $r = 0.9998$, $Sy_x = 3.46$;

-per la GGT, $y = 0.93x + 0.7$, $r = 0.9999$, $Sy_x = 2.05$.

Si può quindi concludere che, per quanto riguarda l'imprecisione, tutti gli obiettivi di accettabilità sono stati raggiunti o superati. Un significativo bias fotometrico si è evidenziato alle lunghezze d'onda di 340 e 412 nm, peraltro totalmente compensabile attraverso un'opportuna procedura di ricalibrazione.

M009

Cosio G., Dal Checco P., Tait M., Peer E., Raffagnini A.

CONFRONTO TRA DAX 96 E CX7 RELATIVAMENTE AD ALCUNI PARAMETRI BIOCHIMICI

Laboratorio di Biochimica Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Regionale, Bolzano

Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione delle correlazioni esistenti tra la strumentazione in dotazione nel settore urgenze (CX7 Beckman) e quella della strumentazione principale del Laboratorio (DAX 96 Bayer), relativamente a 14 parametri di chimica clinica ed enzimologia (AST, ALT, Bilirubina Totale, Calcio, CK, Cloro, Colesterolo, Colinesterasi, Creatinina, Proteine Totali, Potassio, Sodio, Urea). In una prima fase è stata valutata la correlazione tra i dati relativi ai sieri di controllo in giorni successivi per tre settimane sui due strumenti, considerando, per ogni parametro e per ciascun strumento, tre livelli di concentrazione (Decision 1,2,3). Per la valutazione statistica, relativamente ai sieri di controllo, è stato utilizzato l'indice *t* di Student. In una seconda fase sono stati saggiati sui due analizzatori considerati dieci campioni di siero al giorno per tre settimane ($n=150$), scelti in modo da coprire l'intervallo analitico di ciascun esame. I dati relativi ai campioni di siero sono stati analizzati statisticamente tramite il metodo della regressione non parametrica secondo Passing & Bablok. L'esame dei dati permette di osservare che esiste una significativa differenza tra i dati di correlazione ottenuti con i sieri di controllo e quelli ottenuti sui campioni dei pazienti. Considerando i valori del *t* di Student, relativamente ai sieri di controllo, si giungerebbe alla conclusione che le due macchine non siano correlate tra di loro. Considerando invece i dati riferiti ai sieri dei pazienti presi in esame, si giungerebbe a tutt'altra conclusione. Una spiegazione possibile di questa differenza può essere rappresentata dal fatto che il materiale di controllo preso in considerazione è un siero a matrice non umana, mantenuto liquido mediante l'aggiunta di glicole etilenico: è quindi possibile che variazioni di concentrazione su analizzatori diversi (tra l'altro previste dagli stessi produttori) siano dovute ad interferenze legate alla natura del siero di controllo.

Concludendo, questo studio di correlazione deve diventare una normale pratica di controllo, per incrementare la "produttività clinica" del Laboratorio.

M010

BrunoFranco M., Montani A., Vimercati M., Vanelli S.

UTILIZZO DELL'ELETTROFORESI CAPILLARE NELLA ROUTINE DI LABORATORIO

Dip. Pat. Clin., Presidio di Casalpusterlengo (ASL LODI)

Nel nostro Laboratorio viene utilizzato nella normale attività routinaria lo strumento per elettroforesi capillare Paragon CZE 2000; si tratta di un analizzatore a lotti, in grado di eseguire l'elettroforesi di proteine sieriche e l'elettroforesi a immunofissazione mediante sottrazione. La corsa elettroforetica viene effettuata ad un voltaggio di 9000 volts e ad una temperatura di 24 °C. Viene impiegato un tampone borato ed il campione viene automaticamente diluito 1:20. La cadenza analitica dello strumento è di 42 campioni\ora in modalità elettroforesi e di 5 campioni\ora in modalità immunosottrazione. Per quanto riguarda la rilevazione del segnale, un gruppo di fibre ottiche dirige la luce ultravioletta ad ognuna delle finestre dei capillari, un'altra fibra ottica completa il percorso della luce dalla finestra dei capillari al rivelatore di raggi ultravioletti. Nella nostra esperienza, l'utilizzo del sistema CZE 2000 Paragon si è dimostrato estremamente affidabile e facilmente applicabile ad un laboratorio ospedaliero. Innanzitutto il sistema consente di ottenere risultati in breve tempo, l'interpretazione è estremamente semplice, dal momento che l'operatore valuta a video un normale profilo elettroforetico. E' sicuramente vantaggiosa la completa automazione delle diverse fasi analitiche, garantendo una minore possibilità di errore grossolano da parte dell'operatore e una riduzione del rischio biologico. La strumentazione in nostra dotazione risulta poi essere dotata di un software applicativo facilmente utilizzabile sia in maniera svincolata che interfacciata con un host computer. E' sicuramente rilevante la gestione completamente in automatico dell'immunosottrazione, con possibilità di tipizzazione rapida e semplice di una componente monoclonale. Si è dimostrata estremamente utile nella valutazione praticamente immediata di un picco in zona Beta; questo può infatti rappresentare oltre ad una banda monoclonale solitamente di classe IgA, anche un aumento della transferrina o del fattore 3° del complemento. Se, in seguito ad immunosottrazione, il picco in Beta non subisce un abbattimento, allora ne possiamo sicuramente escludere l'origine monoclonale. Nel corso di circa 3 anni lo strumento è stato utilizzato nella routine per l'analisi di più di 20000 sieri con piena soddisfazione ed il ricorso a separazione su gel di agarosio in un solo caso che presentava dubbi interpretativi per la presenza di un picco monoclonale in zona γ troppo ristretto per l'analisi strumentale capillare. In conclusione, a nostro parere, l'elettroforesi capillare può rappresentare una valida alternativa, nel laboratorio di analisi chimico-cliniche, alla classica elettroforesi zonale, come ad esempio quella su acetato di cellulosa.

M011

Biagini G., Maiavacca R., Giavardi C., Xaiz L., Bettinardi N.*, Bosoni M., Torresani E.

CREATININA JAFFÈ E CREATININA ENZIMATICA: DUE METODI A CONFRONTO

Laboratorio di Chimica Clinica-Clinica del Lavoro-I.C.P.-Milano *Laboratorio Analisi-Ospedale di Sesto San Giovanni-Sesto San Giovanni-Milano

Il metodo Jaffè, una reazione chimica relativamente non specifica, è utilizzata da oltre 100 anni ed è tuttora in uso per il dosaggio dei livelli di creatinina nel siero. Sono state introdotte alcune modifiche di carattere cinetico per gli analizzatori automatici allo scopo di ridurre le interferenze del metodo; queste applicazioni, però, sono ancora non specifiche, infatti il dosaggio continua ad essere soggetto a interferenze quali: emoglobina, bilirubina e chetoni a seconda dell'applicazione usata. Hoffman e Feld hanno attuato una modifica nell'applicazione del metodo cinetico di Jaffè per la creatinina su analizzatori Hitachi che riduce l'interferenza da bilirubina ed emolisi utilizzando un "serum blank". La Boeringher Mannheim ha adattato una modifica "rate blanked" al metodo su tutti gli strumenti Hitachi. La valutazione multicentrica effettuata allo scopo di validare il metodo aveva evidenziato un bias positivo assoluto in paragone agli altri metodi. Una ristandardizzazione del calibratore e la compensazione (un numero costante sottratto da tutti i risultati) hanno permesso di eliminare dal metodo anche l'interferenza della matrice proteica. Certamente l'utilizzo di metodi enzimatici per il dosaggio della creatinina è in grado di eliminare tutte le aspecificità con costi però molto più elevati. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la correlazione tra il metodo B.M. Jaffè cinetico rate blanked con compensazione e il metodo enzimatico per il dosaggio della creatinina sierica. Abbiamo esaminato 100 campioni di siero di pazienti provenienti dal reparto "Dialisi" con valori di creatinina sierica compresi tra 0,16 mg/dl e 11,54 mg/dl e li abbiamo testati su Hitachi 917 ROCHE con metodo Jaffè cinetico rate blanked con compensazione e su Vitros 250 ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEM con metodo enzimatico. La correlazione tra i due metodi è stata valutata mediante regressione lineare $r=0,997$. Alla luce dei risultati ottenuti ci sentiamo di affermare che il metodo ROCHE Jaffè cinetico rate blanked con compensazione per il dosaggio della creatinina è in grado di eliminare le aspecificità del vecchio metodo Jaffè e non rende indispensabile l'utilizzo del metodo enzimatico nettamente più dispendioso.

Bibliografia: A.F Swanson Multicenter Evaluation of the B.M.Compensated,Rate-Blanked Creatinine/Jaffe Application on BM/HITACHI System. Adv Clin.Diag. 1993.

M012

Napoli P.*, Battaglio S., Astorino D., Di Bello C., Tortarolo S., Boccadoro M.

MESSA A PUNTO DI UNA METODICA DI IMMUNOFISSAZIONE AD ALTA RISOLUZIONE SUL SISTEMA DI ELETTROFORESI HYDRASYS SEBIA

Divisione Universitaria di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista" di Torino e *Laboratorio Analisi dell'Ospedale Evangelico Valdese di Torino.

L'immunofissazione ad alta risoluzione trova il suo impiego non tanto nella ricerca di piccole componenti monoclonali (MC) su una popolazione non selezionata, quanto nella definizione di remissione completa (CR) in pazienti affetti da Mieloma Multiplo (MM) sottoposti a chemioterapia ad alte dosi e trapianto di midollo.

A questo fine, infatti, non sono di grande utilità le metodiche di biologia molecolare perchè difficilmente questi pazienti raggiungono, accanto ad una CR a livello clinico, anche una negativizzazione molecolare. Occorre pertanto un parametro di laboratorio che sia, da un canto più sensibile dell'elettroforesi ad alta risoluzione (piccole CM potrebbero non essere visibili se comigranti con altre proteine, soprattutto in zona beta), dall'altro non così sensibile come la metodica della PCR che rivelerebbe la presenza della malattia residua anche se il paziente non ne presenta più i segni clinici. E' stata messa a punto una metodica di immunofissazione ad alta risoluzione su gel di agarosio in semiautomatico. A questo scopo la ditta SEBIA Ciampolini ha gentilmente modificato i parametri della corsa elettroforetica del suo strumento (HYDRASYS LC) permettendoci di ottenere una maggiore lunghezza dei tracciati (circa 5 cm). Sono state approntate le maschere per la deposizione degli antisieri impiegando il principio della Reverse Immuno Fixation (1), cioè con una larghezza della fessura di deposizione inferiore rispetto a quella del tracciato dei campioni (1,5 mm contro 4 mm). Gli opportuni antisieri (BIOCI, Airasca, Torino) sono stati depositati utilizzando un volume di 15 uL. I tempi di incubazione e le successive procedure seguono le indicazioni della metodica di immunofissazione HYDRAGEL IFE della SEBIA Ciampolini.

I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti permettendoci di individuare le piccole MC e le bande oligoclonali dei pazienti durante la terapia, seguirne la riduzione fino all'eventuale scomparsa e definire questo momento come raggiungimento del quadro di CR.

1) Ciaio C., Marietti G. Reverse Immuno Fixation: characteristics of a new technique. Pan.Med. 1987; 29 (3), 251-57.

M013

Ciaiolo C., Battaglio S., *Marietti G.

CROSS STAR IMMUNOFIXATION (CSI): CHARACTERISTIC OF A NEW TECHNIQUE

Department of Medicine and Experimental Oncology,
Section of Ematology, University of Turin – ITALY; and
*Laboratory of Clinical Pathology, “Amedeo di Savoia”
Hospital, Turin - ITALY

The Cross Star Immunofixation (CSI) is a new precipitation technique based on the cross seeding of antigen to the respective antibody. The name of this method results from the particular star shape of the immunoprecipitate: a quadrangular core with four stellar rays overflowing from its edges. The CSI (patented 1998) represents a synthesis between the immunodiffusion by Ouchterlony, of which it keeps the performances about the spontaneous achievement of the Ag/Ab equilibrium and its easy execution, and the immunoprecipitation by Alper, of which it keeps the sensitivity and the speed of response. In comparison with the immunodiffusion it doesn't present problems rising from the low sensitivity and the high time of response whereas, in comparison with the immunofixation, it results of easier execution and shows an excellent skill to form the immunoprecipitation, even in condition of remarkable loss of Ag/Ab equilibrium.

The CSI is a “in situ” precipitation method which has the peculiar characteristic of Ag seeding crossed with the seeding of the respective antibody. In this way the immediate contact of the Ag to its Ab allows the spontaneous achievement of the Ag/Ab equilibrium with the slightest diffusion as far as possible. By this technique, it's possible to obtain a precipitate in its typical shape in a short time and with a minimal amount of substance. It is possible to use any antiserum or soluble antigen, it is applicable both in the experimental research and in some routinary analysis. For example, in the field of research the CSI can be used for the production of policlonal or monoclonal antisera to verify any immunological response against a certain antigen. In the field of the routinary analysis the CSI can be used anywhere it is needed the availability of a qualitative or semi-quantitative system, it can be used in the analysis for the characterization of the proteinuria by using antisera as anti-Albumin, ?-1Microglobulin, IgG, free light chains, etc. Moreover it can be used in the investigation of the autoantibodies to coagulation factors, to complement modulators. In the field of the Systemic Autoimmune Diseases, where the technique by Ouchterlony still represents the reference technique for specificities such as Ab anti Scl 70 and anti Jo-1, the CSI gives a more sensitive alternative, provided that the respective extractive antigens purified by immunoaffinity chromatography or recombinant immunoprecipitating antigens are used.

M014

Battista C., Ionizzo F., Demarin G. e Olivieri V.

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER L'ANALISI MULTIPARAMETRICA DI AUTOANTICORPI (ENEASYSTEM III)

Bioallergy International, via del Follatoio, 12 - Trieste

L'impiego di metodiche immunoenzimatiche per la ricerca di anticorpi IgG e IgM nelle patologie autoimmuni, in alternativa e a conferma delle metodiche in immunofluorescenza, ha recentemente incontrato una crescente accettazione nei Laboratori clinici, in ragione dei notevoli miglioramenti ottenuti in termini di sensibilità, specificità e riproducibilità. La vasta gamma di test da effettuare per giungere alla definizione di un profilo sierologico completo ha posto notevoli problemi all'automatizzazione di queste metodiche. Nell'approccio tradizionale, ogni parametro viene determinato in un test indipendente, con esecuzione contemporanea di standard e campioni e con metodiche spesso diverse per le condizioni sperimentali (tempo di incubazione, diluizione del campione, concentrazione del coniugato, ecc.).

L'obiettivo che ci siamo proposti è stato quello di realizzare la massima uniformità delle metodiche, mediante una standardizzazione di tutti i reattivi necessari, al fine di riunire i test per pochi gruppi omogenei, referendo i risultati contro uno standard comune al gruppo di analisi. Mediante la memorizzazione della curva standard è quindi possibile eseguire, su uno strumento dedicato e in completa automazione, corse analitiche relative a differenti parametri, in ogni combinazione di campioni e test. Per ANA screening, ENA screening e singoli antigeni nucleari estraibili si è adottata una curva di riferimento basata sugli anti-SSA; per dsDNA, ssDNA e Istoni si è applicato lo Standard Internazionale WO80, mentre per gli anti-fosfolipidi si impiegano gli standard di Harris.

Vengono riportati i risultati relativi alla riproducibilità tra dosaggi (C.V. medio per le varie curve compreso tra 6 e 10%), alla stabilità dei reattivi, tutti pronti per l'uso (immunoreattività residua del coniugato HRP pari all' 85-90% dopo stress di 2 settimane a 37°C), all'assenza di fenomeni di carry-over tra sieri, e alle performances analitiche per i più importanti parametri. La sensibilità e la specificità dei vari test, su campioni positivi e negativi classificati mediante metodiche in immunofluorescenza e dati clinici, sono risultate maggiori o uguali al 95%

Riferimenti Bibliografici

Humbel RL. Auto-Immunité, auto-anticorps et maladies auto-immunes. In: Humbel RL, ed. Autoanticorps et maladies autoimmunes. Paris: Elsevier, 1997; p.71-3

M015

Di Bello C., *Liraluce F., *Pennacino P., *Ricci E., Astorino D., Tortarolo S., Battaglio S.

VALUTAZIONE DELLE IgA SECRETORIE NEL LAVAGGIO NASALE: UTILIZZO DI UNA METODICA DI IMMUNOFISSAZIONE SU PIASTRA

Divisione Universitaria di Ematologia e *II Clinica Otorinolaringoiatrica, Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista" di Torino

Al fine di evidenziare la presenza o meno delle IgA secretorie presenti nelle prime vie aeree viene impiegato normalmente il lavaggio nasale. E' però una procedura che presenta notevoli problemi legati alla estrema variabilità nel recupero delle proteine, manovra che dipende dall'abilità dell'operatore e dalla collaborazione del paziente. Non ha pertanto un grande significato la quantificazione delle IgA secretorie con questo metodo: gli eventuali bassi livelli riscontrati potrebbero essere dovuti a scarsa presenza di materiale proteico a causa di un prelievo eseguito in modo non ottimale. Per questo motivo non è possibile standardizzare la procedura e, nella migliore delle ipotesi, si possono ottenere da questi campioni solo delle indicazioni di ordine qualitativo (riduzione, assenza delle IgA secretorie), ma non quantitativo. Abbiamo pensato di impiegare una metodica di laboratorio che desse anche un'indicazione sulla corretta procedura di prelievo e sulla eventuale contaminazione plasmatica.

A tale scopo sono state utilizzate delle immunoprecipitazioni per evidenziare la presenza di albumina (se assente: lavaggio non ottimale), IgG (se presenti in notevole quantità: contaminazione plasmatica), IgA e frammento secretorio (se assenti o ridotte: deficit totale o parziale di IgA secretorie), oltre a questi antisieri è stato aggiunto anche un anti-lisozima.

I campioni, ottenuti utilizzando per il lavaggio nasale 10 ml di soluzione fisiologica, sono stati concentrati almeno 25x e sottoposti a Cross Star Immunofixation (CSI). Questa nuova metodica permette il contemporaneo rilevamento degli antigeni interessati, se si possiedono gli opportuni anticorpi, e, nel nostro caso, fornisce l'indicazione immediata della attendibilità del prelievo e della presenza, o meno, delle IgA secretorie.

Sono stati eseguiti 30 prelievi, 9 di questi presentavano albumina assente o in quantità minima e sono stati giudicati non idonei, uno conteneva elevate quantità di albumina e IgG ed è stato scartato in quanto contaminato da plasma, 20 erano caratterizzati da presenza di albumina, assenza di IgG e sono stati giudicati idonei per la valutazione delle IgA secretorie.

La tecnica della CSI si è rivelata pertanto di facile esecuzione, rapida, poco costosa ed è fonte di informazioni di notevole importanza nella diagnostica dei deficit di IgA secretorie.

M016

Pastore A., Lo Russo A., Casciani S., Greco M., Rizzoni G. and Federici G.

SEMI-AUTOMATED METHOD FOR DETERMINATION OF CYSTINE CONCENTRATION IN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

Bambino Gesù Children's Research Hospital, Piazza S. Onofrio, 4 - 00165- Rome

A semi-automated method for determination of cystine in cystinotic and heterozygotes polymorphonuclear leukocytes was carried out in our laboratory. After isolation and sonication of polymorphonuclear leukocytes, the concentration of cystine is measured utilising a fully automated high-pressure liquid chromatography. The intra- and inter-assay CVs were 2% and 4.7%, respectively, and the mean analytical recovery was close to 100%. Polymorphonuclear leukocytes cystine concentrations in 20 healthy subjects ranged from 0.01 to 0.19 nmol $\frac{1}{2}$ cys/mg protein (mean 0.08; SD 0.06); mean polymorphonuclear leukocytes cystine concentrations in 24 obligate heterozygotes was 0.9 nmol $\frac{1}{2}$ cys/mg protein (SD 0.6), allowing us to detect individuals heterozygotes for nephropathic cystinosis.

M017

Pastore A., Bernardini S., Dello Strologo L., Tizzoni G., Cortese C. and Federici G.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF INULIN AND P-AMINOHIPPURIC ACID IN PLASMA AND URINE BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Bambino Gesù Children's Research Hospital, Piazza S. Onofrio, 4 - 00165- Roma

A simple, accurate and sensitive high-performance liquid chromatographic method with UV detection was carried out to measure plasma and urine concentrations of both p-aminohippuric acid (PAH) and inulin, using p-aminobenzoic acid (PABA) as internal standard. A Nova-Pak C₁₈ column (150 x 3.9 mm, 4 µm) was used. The solvent A was 3.2 mmol/L HCl, pH 2.5, and B was acetonitrile/3.2 mmol/L HCl (60:40, v/v), pH 2.5. The separation was carried out in 4 min with a flow-rate of 1 ml/min, and the absorbance monitored at 280 nm.

Within the investigated concentration ranges of inulin (0.1-0.8 mg/ml) and p-aminohippuric acid (0.078-0.625 mg/ml), good linearity ($r > 0.99$) was obtained. Within-run CV ranged from 2.9% to 6.1% and between-run CV ranged from 6.4% to 10%. Analytical recovery were 101-112%, with little differences between plasma and urine samples. The detection limit was 1 µg/ml for the analytes studied.

M019

Maffi D.*, Pasquino M.T.*, Caforio M.P.*, Caprai P.*, Tarzia A.*, Cianciulli P.°, Sorrentino F.° e Salvati A.M.*

PROTOCOLLO PER LA DIAGNOSI MOLECOLARE DEL DEFICIT DI G6PD

*Laboratorio di Biochimica Clinica Istituto Superiore di Sanità, Roma

° Ospedale S.Eugenio Divisione di Ematologia, Roma

La diagnosi del deficit di G6PD si basa sul dosaggio dell'attività enzimatica nei globuli rossi. Questo test è sensibile e specifico per la diagnosi dei maschi emizigoti e delle femmine omozigoti mentre da luogo ad una quota elevata di falsi positivi o falsi negativi nella diagnosi delle femmine eterozigoti. L'analisi genica determina un salto di qualità nella diagnosi delle femmine eterozigoti e consente in tutti i casi una migliore valutazione del rischio clinico che è collegato a caratteristiche specifiche delle varianti molecolari. Si descrive un protocollo per la diagnosi molecolare del deficit di G6PD validato mediante lo studio n. 160 casi nella regione Lazio (M 85; F 75). Il protocollo comprende 4 livelli di indagine successivi.

I: tutti i casi. Dosaggio dell'attività enzimatica. **II: M e F carenti, F con attività enzimatica normale, ma con anamnesi personale e/o familiare positive.** Screening della G6PD Mediterranea (classe II) mediante amplificazione allele specifica (ARMS). **III: a) M con valori di attività enzimatica <10% del normale.** Ricerca di altre varianti di classe II mediante amplificazione del DNA ed analisi dei frammenti di restrizione ottenuti con endonucleasi specifiche (PCR-RFPL) (ordine di priorità: Union, S. Antioco, Cassano, Cosenza). **b) M con attività enzimatica > 10% del normale.** Ricerca di varianti di classe III mediante i) ARMS per la G6PD Seattle, ii) PCR-RFPL per altre varianti (ordine di priorità: A⁻, Montalbano, Sibari). **c) F carenti o normali con anamnesi positiva.** Ricerca delle varianti di classe II e III con i metodi e le priorità indicati per i gruppi **a** e **b**. **IV: tutti i casi non caratterizzati nei livelli precedenti.** Identificazione di varianti rare (prevalentemente di classe I) o sconosciute mediante analisi dei polimorfismi conformazionali del DNA a singola elica (SSCP) e della sequenza nucleotidica dei frammenti anomali. Le basi razionali del protocollo sono: i) l'impiego di metodi rapidi e poco costosi ai livelli I e II; ii) l'utilizzazione di procedimenti diversificati per i due sessi; iii) l'analisi molecolare nelle femmine con attività normale ed anamnesi positiva; iv) l'introduzione di metodi di screening molecolare (ARMS) per le varianti con frequenza più elevata; v) la ricerca delle varianti molecolari secondo priorità basate sulla frequenza di osservazioni nella popolazione italiana. Applicando il protocollo descritto alla nostra casistica è stato possibile incrementare del 32% il numero di femmine eterozigoti diagnosticate; sono state inoltre determinate le seguenti frequenze alleliche (%): Mediterranea 59; Seattle 20; A⁻ 4.2; Cassano 1.8; Sibari 1.2.

M020

Padano G., Masi S., Cianciulli M., Forino E., Varriale V.* and Masi V.

GENOTIPIZZAZIONE DEL VIRUS DELL'EPATITE C MEDIANTE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) CON CINQUE COPPIE DI PRIMERS SPECIFICI

A.O. S. GIUSEPPE MOSCATI Lab. Centrale di Analisi Chimico-Cliniche e Virologiche di AVELLINO

*Università degli Studi "Federico II" - DAsMeLab - Napoli

Il virus dell'epatite C (HCV), identificato alla fine degli anni '80 mediante tecniche di biologia molecolare, è oggi ritenuto il maggiore responsabile eziologico delle epatiti acute e croniche non A non B a trasmissione parenterale. Il virus dell'epatite C è un virus a RNA ed appartiene alla famiglia delle flaviviridae. Il virus misura un diametro di circa 50-60 nm, è incapsulato e contiene un genoma ad RNA di circa 9400 bp, codifica per una poliproteina di 3010-3011 aminoacidi, che viene successivamente processata da proteasi virale e/o cellulari per dare origine alle varie proteine virali. Le sequenze genomiche più conservate sono quelle della 5' UTR, insieme al gene core e ad alcuni segmenti delle regioni NS3 e NS5. I geni più variabili sono quelli che codificano per l'envelope virale (E1 e E2/NS1) e l'NS2.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche di diversi isolati virali ha permesso di evidenziare l'esistenza di almeno 6 genotipi, alcuni dei quali mostrano una differente distribuzione geografica. Sono state presentate diverse classificazioni tra cui quella più attuale proposta da Simmonds e coll. Prevede il raggruppamento dei diversi isolati virali in sei genotipi distinti, ciascuno caratterizzato da più sottotipi (a, b, c). Secondo questa suddivisione appartengono allo stesso tipo quei virus che presentano una identità nucleotidica di almeno il 70%, rientrano nello stesso sottotipo quegli isolati con equivalenza di almeno l'80%.

Abbiamo analizzato n.102 pazienti positivi per HCV RNA provenienti dalla nostra provincia.

La ricerca dei genotipi è stata eseguita usando un kit completo in commercio, che utilizza la tecnica di Polymerase Chain Reaction (PCR) con primers tipo-specifico per la regione core, per i seguenti genotipo: I (1a), II (2b), III (2a), IV (2b) e V (3a).

La prevalenza dei genotipi da noi riscontrata risulta così distribuita: in 2 pazienti non è stato possibile classificare, tipo I (1a) n.22, tipo II (1b) n.60, tipo III (2a) n.7, tipo IV (2b) n.0, tipo V (3a) n.9, sono stati rivelati inoltre n.2 pazienti con coinfezioni I (1a) II (1b).

Alcuni studi sono concordi nell'indicare che conoscere i diversi genotipi, oltre che di interesse epidemiologico possano potenzialmente differire per potere patogeno, virulenza, infettività, tropismo cellulare e risposta al trattamento con terapie farmacologiche.

M021

Seminati R.*, Bernini M.*, Decarlis S.***, Dilillo D.***, Biondi M.L.*, Guagnellini E.*

MESSA A PUNTO DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO DELL'APOE CON SONDE FLUORESCENTI. VALIDAZIONE CLINICA IN SOGGETTI PEDIATRICI

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia
**Clinica Pediatrica Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano

E' ormai consolidato il ruolo del polimorfismo dell'ApoE nel metabolismo lipidico.

L'ApoE umana è geneticamente variabile. Si riconoscono tre alleli comuni, chiamati $\epsilon 3$, $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ che codificano per tre maggiori isoforme E3, E2 e E4. L'isoforma ApoE3 è quella predominante, le altre due differiscono per una sostituzione aminoacidica: L'ApoE4 differisce per un cambio di aminoacido in posizione 112 (Cys→Arg) e l'ApoE2 in posizione 158 (Arg→Cys). Queste sostituzioni modificano il legame delle lipoproteine ricche di Trigliceridi e i recettori ApoB/E, con conseguente modifica dei livelli di colesterolo plasmatici.

Le sostituzioni, di tipo C→T (in posizione 3932 e 4070) sono comunemente rilevate usando PCR e digestione enzimatica con l'enzima di restrizione HhaI, seguita da corsa elettroforetica su gel di acrilamide. E' noto che questa procedura è essenziale per la determinazione delle mutazioni puntiformi, ma che la sua sensibilità dipende dalla qualità dell'amplificato e dall'intensità di colorazione del prodotto di digestione.

Riportiamo in questo lavoro un metodo alternativo di genotipizzazione che utilizza lo strumento 7700 SDS (PE Applied Biosystem) e relativi reagenti Taq Man. Per validare la metodica abbiamo genotipizzato 141 bambini seguiti dall'ambulatorio delle dislipidemie della Clinica Universitaria del nostro Ospedale.

Le due metodiche sono risultate essere perfettamente sovrapponibili nella determinazione dei genotipi. La frequenza allelica è stata $\epsilon 2$ 0.02, $\epsilon 3$ 0.88 e $\epsilon 4$ 0.10; dati in accordo con quelli osservati nella popolazione del Sud dell'Europa.

La metodica da noi utilizzata è risultata essere rapida e accurata, in meno di tre ore si può ottenere la genotipizzazione di 40 campioni, con un bassissimo numero di campioni indeterminati da ripetere, problema che si è presentato più volte con la digestione enzimatica.

M022

Leviti S., Bernini M., Casari S., Cecchini F., Biondi M.L., Guagnellini E.

METODO DI GENOTIPIZZAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DI UNA MUTAZIONE PUNTIFORME SULL'ESONE 7 DI NOS ENDOTELIALE USANDO SONDE FLUORESCENTI. VALIDAZIONE CLINICA IN PAZIENTI SCLERODERMICI.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia Osp San Paolo Milano

Lo NO di derivazione endoteliale è sintetizzato dalla L-arginina per mezzo della NO sintasi endoteliale (e-NOS). E-NOS è presente nell'endotelio vascolare, piastrine e molti altri tipi cellulari che producono continuamente modeste quantità di NO. Lo NO di derivazione endoteliale gioca un ruolo importante nella regolazione del tono vascolare ed ha effetti vasoprotettivi impedendo l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei leucociti e la proliferazione cellulare nella muscolatura liscia. Il ruolo importante del rilascio di NO nella regolazione della vasodilatazione basale o stimolata suggerisce che l'attività abnorme della NO-sintasi potrebbe essere implicata in diverse condizioni patologiche come ad esempio ipertensione ed aterosclerosi. La sclerosi sistemica (SSc) ha un importante coinvolgimento vascolare ed è stata ipotizzata una ipoproduzione di NO alla base della vasocostrizione. Recentemente è stato individuato un polimorfismo nell'esone 7 del gene e-NOS (894G→T), considerato un fattore di rischio per malattie coronariche. La sostituzione 894G→T è stata identificata usando PCR e digestione enzimatica con l'enzima Ban II seguita dalla corsa elettroforetica su gel di acrilamide. Riportiamo qui un metodo alternativo per la genotipizzazione di questa mutazione puntiforme usando lo strumento 7700 SDS (PE Applied Biosystem) e relativi reagenti Taq Man. Per validare la metodica abbiamo genotipizzato 123 soggetti normali e 46 soggetti sclerodermici (11 SSC-D, 22 SSC-L, 13 Fenomeni di Raynaud (RP) con entrambi i sistemi, non trovando risultati discordanti. Il metodo Taq Man risulta accurato e rapido. Ci sono molti vantaggi usando questo metodo: in meno di tre ore possono essere amplificati e genotipizzati 40 campioni. I nostri dati preliminari hanno dimostrato una significativa aumentata presenza del genotipo T nei pazienti affetti da Sclerosi Sistemica Diffusa.

	N	SSCD **	SSCL RR	
GG	36	1	13	4
GT	73	6	7	8
TT	14	4	2	1

* $p < 0.05$ vs N ** $p > 0.02$ vs SSC-L

I nostri risultati confermano la validità della metodica Taq Man nell'identificazione di mutazioni puntiformi e ipotizzano questo polimorfismo come fattore di rischio per la SSc.

M023

Drago S.⁽¹⁾, Alaimo C.⁽¹⁾, Sineo L.⁽²⁾, Cavataio F.⁽³⁾, Carroccio A.⁽⁴⁾, D'Amico D.⁽³⁾, Locorotondo N.⁽¹⁾ & Iacono G.⁽³⁾

A NEW SIMPLE AND RAPID "REAL TIME" PCR APPROACH FOR HLA MOLECULAR TYPING OF SICILIAN COELIAC SUBJECTS.

(1) Laboratorio di Ricerche Locorotondo, Palermo;
(2) Dept. Animal Biology University of Palermo;
(3) Paediatric and Gastroenterology Unit, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina" Palermo; (4) Internal Medicine, Univ. Of Palermo, Italy

INTRODUCTION

Coeliac Disease (CD) susceptibility is primarily associated with DQ2 haplotype encoded by DQA1*0501/DQB1*0201 alleles (Sollid L.M., Thorsby E., Gastroenterology 1993; 105: 910-922).

It has been estimated that 10% of first relatives of CD patients develop the disease, even if the 50% of these are asymptomatics.

For the disease evaluation, in these precocious or silent phases, an innovative "real time" PCR approach has been developed and used for HLA-DQ2 and DR4 molecular typing in randomly selected CD subjects in Sicily.

MATERIALS AND METHODS

DNA samples from eighty-one patients have been extracted from peripheral blood samples obtained by finger puncture and collected onto a filter card. DQA1*0501 and DQB1*0201 alleles have been amplified by multiplex PCR reaction; those sample negative for DQ2 underwent to a second PCR in order to amplify the DRB1*04 allele. "Real time" approach has been performed using a 7700 Sequence Detector analysis (PE Applied Biosystems). In order to verify the specificity of the multiplex PCR, serologically determined patients have been enrolled in the trial.

RESULTS

We have found 58/81 (71.61 %) samples positive for DQA1*0501 and DQB1*0201 alleles, 12/81 (14.81%) positive for DRB1*04 allele, 10/81 (12.35 %) positive for DQB1*0201 allele, and 1/81 (1.23 %) positive for DQA1*0501. These results are similar but different to those already published in literature for different CD populations.

CONCLUSION

In conclusion this study describes: 1) a new simple and rapid approach to HLA-CD typing, starting from the finger blood sampling, to the collection and storage of blood spots on filter paper card; 2) a reliable multiplex PCR real time design that, together with 7700 Sequence Detector analysis, allowed a sure evaluation of large sample; 3) the first HLA molecular typing of Sicilian CD patients.

M024

Riunita D.*, Jebeleanu G.**

THE HAEMOCHROMATOSIS HFE (C282Y) MUTATION FREQUENCY IN TRANSYLVANIA

**"Remedium" Polyclinic **U.M.F."Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca Faculty of Medicine Dpt.Biochemistry, 6 Pasteur St., 3400 Cluj_Napoca, Romania.

Haemochromatosis is considered as a common inherited disorder of Caucasians. Its prevalence could be as high as 1 in 300 in the Northern Europe. The homozygosity for C282Y mutation in the HFE gene accounts for 64 - 100% of hereditary haemochromatosis. However the geographical distribution is highly different. A survey of recorded cases in Cluj-Napoca over a 10 years period indicated a rather low incidence of the manifest disease. Based on a simple screening test introduced by Bahavni M., who showed that mildly elevated serum ATL values if frequently associated with early stages of haemochromatosis we investigated 200 random controls and 45 patients with apparently unexplained hepatomegaly. Those with elevated ALT serum values were further analyzed for, transfer in saturation % and for the mutation using PRC_RFLP (RsaI restrictions) method as described by J.N. Feder et.al. In the general population the mutation was found in 3 cases (heterozygous) (1.5%), comparatively with 4 heterozygous and 1 homzygous found among the patients. Screening procedures and genotype determination could be in this respect important for further investigation and therapy. Also even if not the only cause the heterozygous state probable contribute to the liver damage. The rather low frequency in Romania can be due to the Nordic origin of C288Y mutation.

REFERENCES

1. Powell LW, Subbramaniam VN, Yapp TR, J.Hepatology, 1999; 32 (suppl 1): 48 - 62.
2. Carella M, D_Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, et al. Am. J. Hum. Genet. 1997; 60: 828 - 832 .
3. Bhavanani M, Loyd D, Baahattacharyya A, Marples J, Elton P, Worwood M. Gut 2000 ; 46 :707 - 710.
4. Feder JN, Gniirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, et al. Nat Genet 1996; 13: 399 - 408

M025

Salbe C.¹, Ferruzzi E.¹, Trevisiol C.¹, Di Fabio F.², Nascimbeni R.², Salerni B.², Mancuso T.³, Dittadi R.¹.

INDAGINE MOLECOLARE DELLE MUTAZIONI DEL CODONE 12 DEL GENE K-RAS IN DNA ESTRATTO DAL SIERO DI PAZIENTI CON CARCINOMA DEL COLON RETTO

(1) Centro Regionale Indicatori Biochimici Di Tumore, Ospedale Civile di Venezia; (2) Cattedra Chirurgia Generale, Università di Brescia; (3) Oncologia Sperimentale A, Istituto Nazionale Tumori, Milano.

Circa il 40 % dei carcinomi del colon retto presenta mutazioni puntiformi del codone 12 del gene K-ras. L'identificazione di tali mutazioni potrebbe essere impiegata a scopo diagnostico anche se la loro utilità clinica rimane non chiara. Scopo di questo studio è verificare se il gene K-ras mutato, identificato nel siero di pazienti con carcinoma del colon retto, possa considerarsi un marcatore utile per il monitoraggio della malattia.

L'indagine molecolare è stata eseguita tramite la tecnica Mutant Enriched - PCR, un metodo sensibile capace di individuare piccole quantità di DNA mutato in eccesso al wild-type. Le mutazioni al codone 12 del gene K-ras sono state esaminate in DNA estratto dal siero di 35 pazienti e confrontate con il pattern del K-ras nel DNA estratto dal tumore primitivo corrispondente.

La mutazione è stata identificata in 6/35 (17%) sieri e in 13/35 (37%) tessuti analizzati. Il 69% dei pazienti mostrava la stessa distribuzione della mutazione K-ras nel tessuto e nel siero. È stato anche analizzato il DNA estratto dal siero di 22 pazienti con patologie benigne del tratto gastroenterico e nessuno di questi mostrava alterazione al codone 12 del gene K-ras. Alti livelli di CEA erano presenti nel siero di 16 dei 35 pazienti analizzati, quattro dei quali presentavano anche la mutazione del gene ras nel DNA del siero.

I nostri risultati confermano che le mutazioni del gene K-ras possono essere identificate nel DNA circolante estratto da campioni di siero di pazienti con cancro del colon retto e che esiste una corrispondenza tra il pattern di K-ras del siero e del tessuto. Attualmente è in corso l'analisi di una più ampia casistica e del follow-up dei pazienti per verificare la possibile utilità clinica dello studio dello spettro di mutazione del K-ras nel siero di carcinomi del colon retto.

M026

Bellinzoni M., Verardi R., Lanfranchi A., Albertini A., Pirovano S., Imberti L.

STUDIO DELLA RICOSTITUZIONE DEL REPERTORIO T IN BAMBINI SCID SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI IN UTERO

3° Servizio Analisi ed Istituto di Chimica, Spedali Civili di Brescia; Brescia, Italia.

Il Trapianto di Midollo (TMO) costituisce attualmente la terapia di prima scelta per le immunodeficienze combinate gravi (SCID) caratterizzate da gravi anomalie numeriche e/o funzionali a carico dei linfociti T. Particolarmente innovativa è la possibilità di trapiantare bambini con immunodeficienze già prima della nascita; l'aumento della tolleranza immune che caratterizza la gravidanza può infatti favorire l'attecchimento del trapianto eseguito in periodo prenatale diminuendo il rischio di reazioni di incompatibilità (1). Il risultato finale del TMO in utero potrebbe essere una precoce generazione di linfociti con un repertorio T molto eterogeneo, in grado di esercitare fin dalla nascita una corretta sorveglianza immunologica.

Per valutare il coinvolgimento dei linfociti T nel recupero della funzione immune abbiamo voluto analizzare la ricostruzione del repertorio T, dopo trapianto in utero, di quattro bambini di cui tre erano affetti da SCID ed uno da sindrome di Omenn. La metodica per questo tipo di studio ha previsto l'estrazione dell'mRNA da linfociti preparati da campioni sequenziali ottenuti subito dopo il trapianto e a distanza di mesi, la sintesi del cDNA e l'amplificazione (PCR) con primers specifici per le catene del recettore T di interesse.

Per poter saggiare la mono-oligo-policlonalità del materiale amplificato si è poi proceduto all'esecuzione del metodo "heteroduplex" che ci ha consentito di determinare il grado di ricostruzione (o costruzione) della diversità del repertorio T.

I dati preliminari mostrano il passaggio da una situazione iniziale di spiccata oligoclonalità, presente in tutti i bambini da noi analizzati, ad un progressivo aumento della diversità, indice di una sempre maggiore potenzialità dell'organismo di instaurare una corretta immunità cellulo-mediata.

Allo stato attuale stiamo approfondendo ulteriormente tali risultati sperimentali tramite il clonaggio ed il sequenziamento dei prodotti di amplificazione delle diverse catene del recettore T.

(1) Wengler, G.S., Lanfranchi, A., Frusca, T. et al. (1996) *Lancet* **348**:1484-1487.

M027

Cascina S.*, Greco M.*, Bencivenga P.°, Federici G.°, Tizzoni G.*, Pepe G.°

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE MUTAZIONI NEL GENE CTNS IN PAZIENTI ITALIANI

*Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Div. Nefrologia e Dialisi; °Dip. Medicina Interna, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia

La cistinosi nefropatica infantile (NC), è un disordine metabolico raro a trasmissione autosomica recessiva (OMIM*219800), causato da un difetto nella proteina di trasporto della cistina attraverso la membrana lisosomiale, con conseguente accumulo di cistina libera. Clinicamente si manifesta in età pediatrica, con disfunzione renale del tubulo contorto prossimale e nelle forme più gravi con danni a vari organi. L'analisi di linkage ha consentito la localizzazione del gene CTNS, responsabile della malattia, sul braccio corto del cromosoma 17 (17p13) (The Cystinosis Collaborative Research Group 1995) e, successivamente, il suo clonaggio (Town et al. 1998). Studi effettuati su popolazioni Europea, Americana e Franco-Canadese (Town et al. 1998; Shotelersuk et al. 1998) hanno permesso l'identificazione di molte mutazioni tra le quali una delezione di 65 Kb, prevalente negli europei, mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzioni.

Scopo del nostro studio è stato quello di identificare le mutazioni presenti nel gene CTNS di 14 pazienti italiani affetti da cistinosi (riportati nel Registro Italiano della Cistinosi), facendo uso di tecniche di biologia molecolare quali la Reazione a catena della Polimerasi (PCR) e l'analisi degli amplificati mediante CSGE (Conformational Sensitive Gel Electrophoresis), sequenziamento diretto dei frammenti che mostravano eteroduplex, o ricerca di mutazioni già identificate mediante enzimi di restrizione. In particolare, la sola amplificazione ci ha permesso di evidenziare in un paziente la delezione di 65 Kb allo stato eterozigote grazie anche all'utilizzo del locus D17S829, la cui presenza consente di discriminare tra l'omozigosi e l'eterozigosi della stessa (Forestier et al. 1999). L'impiego del CSGE invece, insieme all'utilizzo di enzimi di restrizione, hanno consentito di identificare 8 differenti mutazioni: 357del GACT (Ex3), 856 ins C (Ex8), 1020+1 g>a (Introne 9), 1039-1040 del GT (Ex10), 1261 G>A (Ex11), 1348 G>A (Ex12), 1354 G>A (Ex12), 1366 del ATCGTC TTCGAC (Ex12). Due tra queste mutazioni sono nuove e non si sa ancora se sono patogenetiche. Da un'analisi dei risultati possiamo evincere che l'insieme delle metodiche da noi utilizzate consentono di ritrovare circa l'80% delle mutazioni negli individui con cistinosi (23alleli mutati/28 alleli totali) una percentuale più alta di quella riportata in letteratura, mentre rimane ancora da identificare il rimanente 20%. Inoltre il mancato ritrovamento in Italia di una sostituzione nucleotidica molto frequente in popolazioni del Nord-Europa (W138X Trp>Stop Ex7), può far concludere che lo spettro delle mutazioni in questo gene può variare da una popolazione all'altra.

M028

Dessi M., Motti C.*, Indigeno P., Salvoni I., Casciani S., Gnasso A.°, Federici G.°, Cortese C.

IDENTIFICATION OF THREE PARAOXONASE GENE POLYMORPHISMS BY MULTIPLEX-PCR WITH MISMATCH PRIMERS

Dip. Med. Int. Univ. "Tor Vergata" Roma; *Dip. Strutt. Funz. Pat. Anim. e Biotechn., Univ. Teramo °Dip. Med. Sperim. e Clin., Univ. CZ; ^IRCCS "Bambino Gesù", Roma, Italy

Paraoxonase (PON1) is a calcium-dependent arylesterase entirely bound to HDL, whose gene is located on chromosome 7 in a cluster with two similar genes, PON2 and PON3. PON1 is most likely involved in the removal of lipid peroxidation products from the lipoprotein particles. This activity may be associated with a reduction of the risk for vascular disease by cleansing LDL of oxidized lipids in vivo. Two common polymorphisms at codon 192 (Q-Gln→Arg-R) and at codon 54 (L-Leu→M-Met) in PON1 and one at codon 311 in PON2 (C-Cys→Ser-S) have been intensively studied in the past decade and shown to be associated with the risk for coronary artery disease (CHD). Both PON1-192 R and PON2-311 S alleles seem to be associated with an increased risk for atherosclerosis, whereas PON1-54 L allele is associated with the presence and severity of carotid atherosclerosis. Therefore, a rapid and reliable method for their simultaneous identification at DNA level would be desirable. We developed a DNA-based technique of multiplex PCR with mismatch primers, designed in order to introduce a recognition site for a unique restriction endonuclease (*HinfI*) in one allele of each PCR product, allowing the simultaneous amplification of the three PON polymorphisms by one-tube amplification. The PCR products were digested and separated by electrophoresis on 3,5 % agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. By using this technique, we could assess the relative frequencies of the PON alleles and genotypes in a sample of general population from South Italy. We also identified the haplotype Q(192)-L(54)-S(311) as being prevalent in our population (about 35% of chromosomes), while the apparently risk-associated haplotype R(192)-L(54)-S(311) was found in about 12% of chromosomes. This study was partly supported by a grant from Cofin '98- MURST and partly by a grant from MURST-CNR Biotechnology Program L.95/95.

M029

Priolo G.*, Fenoglio R.°, Canadese C.°, Grillo A.*, Biasiol S.*, Donati Marello B.*, Biancotti P.*, G. Piccoli°, R. Pagni*

EFFETTI DELLA TERAPIA IMMUNOMODULANTE SULL'APOPTOSI CELLULARE NEL TRATTAMENTO DELLE GLOMERULONEFRITI PRIMITIVE E SECONDARIE

* Laboratorio Analisi Baldi e Riberi, ASO S. Giovanni Battista, Torino

° Cattedra di Nefrologia Medica Università di Torino

Il significato biologico dell'apoptosi e' stato chiarito negli ultimi anni come morte cellulare geneticamente programmata, in risposta a stimoli specifici. Tale attivazione procede attraverso una complessa rete di attivatori ed inibitori intracellulari e di superficie, tra i quali il recettore CD95 (o Fas) svolge un ruolo centrale. Di particolare interesse e' il coinvolgimento del processo apoptotico in diversi quadri patologici e soprattutto in campo nefrologico dove e' chiamato in causa nell'evoluzione dei processi di proliferazione intra ed extracapillare e nel danno tubulare acuto e cronico. Sulla base di questi presupposti nel nostro lavoro sono stati analizzati: 1) l'apoptosi in condizioni basali in linfociti periferici di pazienti con diverse patologie renali; 2) l'effetto della terapia immunomodulante orale e del bolo di steroide ev sul fenomeno apoptotico. Lo studio e' stato condotto su 56 pazienti con diagnosi di glomerulonefrite primitiva o secondaria, di nefrite interstiziale o sclerosi multipla, 22 controlli normali e 5 pazienti uremici. Sono stati analizzati su linfociti periferici i seguenti parametri: frammentazione del DNA mediante elettroforesi su gel-agarosio, immunofenotipizzazione in fluorocitometria di CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, HLA-DR, CD3-HLADR e del recettore di superficie CD95. L'indagine effettuata ha dimostrato una apoptosi spontanea basale nel 4.5% dei controlli normali, nel 53% delle glomerulonefriti membranose, nel 12% delle glomerulonefriti lupiche e nel 33% di quelle rapidamente progressive. Tutti i pazienti con presenza di bande apoptotiche dimostravano un quadro periferico nettamente differenziato per la presenza di T8 significativamente ridotti ($p=0.003$), ratio CD4/CD8 significativamente elevata ($p=0.000$), espressione del recettore di superficie CD95 (induttore dell'apoptosi) 3 volte superiore. Per quanto riguarda l'effetto della terapia steroidea, il bolo ev (dosi variabili da 200 mg a 1 gr di metilprednisolone) ha prodotto una linfopenia con induzione di apoptosi in 7 casi; per l'apoptosi in glomerulonefrite membranosa si e' osservata una negativizzazione del reperto, mentre non si hanno avuto variazioni nella glomerulonefrite rapidamente progressiva. La terapia steroidea orale (dosi variabili da 10 a 50 mg di prednisone) valutata in 23 pazienti, ha provocato una riduzione significativa dei linfociti CD8+ ma non una modificazione a breve termine dell'apoptosi.

Mene' P., Amore A.: "Apoptosis potential role in renal diseases". *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1-8

M030

Dassi C., Brambilla P., Signorini S., Gerthoux P., Iacuiti G., Mocarelli P.

PARAOXONASE GLN-ARG192 OLYMORPHISM IN MYOCARDIAL INFARCTION SURVIVORS

Dipartimento Universitario di Medicina di Laboratorio - Azienda Ospedaliera Ospedale Civile di Vimercate, Presidio di Desio, Via Mazzini 1 - 20033 Desio (MI)

Human serum paraoxonase (PON1) is an enzyme exclusively bound to high-density lipoprotein which has been shown to hydrolyze lipid peroxide, thus protecting LDL against oxidative modification. This has led to the proposal that PON1 is an antiatherogenic, anti-inflammatory enzyme. PON1 has two genetically determined polymorphic site giving rise to amino-acid substitution at position 192 (Gln-Arg192) and 55 (Met-Leu55). The substitution of glutamine at position 192 of the allele A (wild type) with arginine gives rise to an alloenzyme, B allele, with high activity respect to paraoxon hydrolysis. Heterozygote subjects (AB alleles) have intermediate values. Studies have indicated that HDL from PON-BB homozygotes is less efficient at protecting LDL against oxidation than HDL from PON-AA homozygotes, suggesting that the activity of the B alloenzyme in metabolizing lipid peroxide is less than that of the A alloenzyme.

Given the potential role of PON1 in preventing LDL oxidation and the presence of functionally significant genetic polymorphism, PON1 Gln-Arg192 substitution has been proposed as a genetic marker of risk of coronary heart disease.

We have studied a possible association between PON1 Gln-Arg192 polymorphism and acute myocardial infarction (AMI) in 147 patients from the Cardiology Department of Desio-Milan Hospital.

Genotyping was performed by PCR-RFLP (1) (amplification of 99 base pair region containing the position 192), digestion with *Alw I* and PAGE, on whole blood sample from post-AMI and healthy control subjects ($n = 119$).

The observed relative frequencies of AA, AB and BB genotype were 0.605, 0.354 and 0.041 respectively in the post-AMI and 0.513, 0.412 and 0.075 in the control population. The frequency of A allele was higher ($X^2 = 5.93$, $p < 0.05$) in the patients (0.78) than in the control group (0.72).

These preliminary results show an association between PON1Arg192 polymorphism and myocardial infarction. We are extending the study on a larger cohort.

Bibliografia:

1) Humbert R, Adler DA, Distèche CM, Hasset C, Omiecinski CJ, Furlong C. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Gen* 1993; 3: 73-76.

M031

Priolo G.*, Casalis S.°, Grosso I.°, Ciocia E.*, Ferrero E.*, Zaccaria T.*, Isaia G.C.°, Aimò G.*

VITAMIN D RECEPTOR POLYMORPHISMS AND OSTEOPOROTIC FRACTURES IN ITALIAN WOMEN

*Laboratorio Analisi Baldi e Riberi, ASO S. Giovanni Battista, Torino

°Dipartimento di Medicina Interna Università di Torino

Vitamin D receptor (VDR) gene is considered one of candidate genes affecting bone and mineral metabolism. The association between VDR gene polymorphisms and bone mineral density (BMD) as well as relationships between VDR genotype and the risk of fractures are uncertain. To determine whether VDR polymorphisms are associated with the presence of fractures and with primary postmenopausal osteoporosis we conducted a case-control study on 97 Italian women of Caucasian origin, including 39 postmenopausal subjects (mean age 64 years, from 46 to 78) who had previous atraumatic fractures of hip (8), vertebrae (21) and wrist (11) as documented by radiographs, and 58 healthy control women without fractures (mean age 55 years, 25-78). VDR polymorphisms were assessed by polymerase chain reaction amplification of genomic DNA using TaqI and BsmI restriction site endonuclease digestion. The genotypes were defined as TT, Tt, tt, and BB, Bb, bb, where T and t refer to the absence and the presence, respectively, of TaqI restriction site, whereas B and b represent the absence and the presence, respectively, of BsmI restriction site. Since B and t, b and T are in linkage disequilibrium on chromosome 12. In the same patients also the hip BMD was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) and women were divided in osteoporotic and not osteoporotic according to WHO criteria. In the group of 39 fractured women we found 25% TTbb, 20% TtBb and 53% ttBB, while in 58 controls genotype frequencies were 37% TTbb, 34% TtBb and 25% ttBB ($p=0.023$ by chi-square test). Overall, mean femoral neck BMD was 0.636 and total femoral BMD was 0.746. VDR genotype frequencies were 20% TTbb, 29% TtBb and 5% ttBB in 24 osteoporotic women, and 34% TTbb, 26% TtBb and 32% ttBB in the remaining 73 not osteoporotics (p =not significant). Our results show that the genotype BB is significantly more represented in the fractured women and could then be used as a marker of an increased fracture risk. Further studies are needed to investigate the role of VDR genotype determination either alone or associated with other genetic markers in the evaluation of the risk of fractures.

Ensrud K.E., Stone K., Cauley J.A., White C., et al.
Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of fractures in older women. For the Study of Osteoporotic Fractures Research Group.

J. Bone and Mineral Res. 14 (10): 1637-45, 1999 Oct.

M032

Obici L.*, Cardaciotto C.*, Bruno B.*, Paladini G.°, Anesi E.°, Perfetti V.°, Moratti R.# e Merlini G.*

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL GENE MEFV IN PAZIENTI AFFETTI DA FEBBRE MEDITERRANEA FAMILIARE

Lab. di Biotecnologie*, Med. Int ed Oncol. Med.°, Serv. Anal. Chimico-Cliniche#, IRCCS Policlinico San Matteo e Università di Pavia, P.le Golgi, 2 27100 Pavia

La Febbre Mediterranea Familiare (FMF, MIM 249100) è una malattia ereditaria autosomica recessiva caratterizzata dalla insorgenza di febbre ricorrente associata a sierosite o sinovite. Il gene-malattia, denominato MEFV, è localizzato sul cromosoma 16 e fino ad oggi sono state identificate 16 mutazioni in pazienti appartenenti alle popolazioni mediterranee più frequentemente colpite, quali i Turchi, gli Armeni, gli Ebrei non-Ashkenazi e gli Arabi. (1)

Abbiamo ricercato la presenza di mutazioni nel gene MEFV in 17 pazienti italiani con diagnosi clinica di FMF, appartenenti a 13 famiglie non correlate.

I campioni di DNA genomico estratto da sangue periferico sono stati indagati per la presenza delle 10 mutazioni più frequenti mediante metodi diversi: lo screening delle mutazioni contenute nell'esone 10 del gene è stato effettuato mediante sequenziamento automatico di frammenti amplificati attraverso PCR mentre le varianti E148Q, P369S e F479I sono state ricercate mediante analisi di polimorfismi di restrizione.

Abbiamo identificato 21 alleli mutati su 28 cromosomi indipendenti (75 %) nei quali è attesa la presenza di una mutazione. 6 pazienti sono eterozigoti composti e 2 sono omozigoti. Negli altri 9 pazienti è stata dimostrata la presenza di una sola mutazione. Abbiamo riscontrato 5 diverse mutazioni di cui le più frequenti sono la M694V, presente in un terzo dei cromosomi e la E148Q, che interessa 7/30 cromosomi (23 %). Le varianti M694I, M680I e V726A sono state identificate una sola volta.

Nella nostra casistica lo screening molecolare consente l'identificazione di circa il 75% dei cromosomi affetti, in accordo con quanto riportato nelle popolazioni in cui la malattia presenta una prevalenza elevata. L'elevata eterogeneità di mutazione che caratterizza questo gene consente di ipotizzare l'esistenza di altre varianti, attualmente sconosciute. La ridotta penetranza di alcune mutazioni potrebbe spiegare il quadro clinico più sfumato in alcuni dei nostri pazienti. Sono questi i casi che maggiormente beneficiano dell'indagine molecolare, poiché l'identificazione di almeno un allele mutato, in presenza di un quadro clinico suggestivo ma non diagnostico, può fornire l'indicazione ad intraprendere il trattamento con colchicina, in grado di prevenire l'insorgenza di amiloidosi secondaria.

1. Aksentijev I, Torosyan Y, Samuels J et al. Am. J. Hum. Gen. 1999; 64:949-962.

M033

Bellincampi L.¹, Motti C.², Bernardini S.¹, Pujia D.³,
Ardagna F.^{1,3}, Ballerini S.¹, Iori R.¹, Cortese C.¹,
Federici G.

IDENTIFICATION OF AN EXON SKIPPING IN THE HUMAN ABCA1 GENE

¹Dept. of Internal Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata, Rome; ²Inst. of Bioch. and Molec. Biology, Univ. of Teramo; ³Clinical Biochemistry, Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome, Italy.

ABC transporters represent one of the largest family of proteins encoded by at least a thousand of genes. So far, four genes from the ABCA subfamily have been fully sequenced, namely ABCA1, ABCA2, ABCA3 or C and ABCR. The ABCA1 transporter, found in both prokaryotes and eukaryotes, has four domains: two transmembrane domains and two cytoplasmic ATP-binding cassettes which provide the energy for ligand transfer. The ABCA1 transporter carries many different ligands, including ions, aminoacids, sugars and lipids.

ABCA1-mediated lipid export is defective in Tangier disease, a HDL deficiency syndrome, resulting in increased amounts of cholesterol ester storage in cells. Studying the modulation of the ABCA1 expression in different models, we identified the presence of two variants of ABCA1 mRNA in human umbilical endothelial cells as well as in smooth muscle cells and in leukemia T cell lines Jurkat.

Firstly we amplified a region of the ABCA1 cDNA including exons 1 to 5 (nt 5-483), obtaining two different bands, the expected one (479 bp) and an extra band (337 bp). We confirmed that both bands are generated by ABCA1 cDNA amplification using endonuclease restriction (*Hinf*I and *Cfo*I).

Analyzing the cDNA sequence of exons 1-5 we hypothesized that the extra band could result from the lack of exon 3. To confirm this we characterized the product of 337 base pairs through PCR using two different sets of primers: the first one amplified a region from exon 2 to 5, the second amplified a region from the middle of exon 3 to exon 5. As expected, the first set of primers led to two amplification products while the second set of primers led to only one amplification product. Finally, we isolated and sequenced both variants showing the absence of exon 3 in the minor one. The exon 3 contains the start codon of the ABCA1 gene. Thus its removal by exon skipping should result into an alternative transcription start site which remains to be better elucidated.

This study was supported partly by a grant from MURST-CNR Biotechnology Program L.95/95 and partly by a grant from MURST-Cofin '98.

M034

Benerini Gatta L., Zanella I., Cariani E., Alberini A., Finazzi D.

QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI BACE (BETA-SITE APP-CLEAVING ENZYME) IN TESSUTI CEREBRALI DI PAZIENTI AFFETTI DA ALZHEIMER

III Laboratorio Analisi, AO Spedali Civili Brescia, 25123 Brescia.

I depositi di beta amiloide a livello cerebrale sono una delle caratteristiche anatomo-patologiche fondamentali della malattia di Alzheimer. Diversi dati in letteratura suggeriscono che anomalie a carico del *processing* proteolitico cui è sottoposta la Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) possano ricoprire un ruolo fondamentale nella genesi di tali placche; in particolar modo sembra essere fondamentale una prevalenza del taglio proteolitico ad opera della beta secretasi rispetto a quello dell'alfa secretasi.

La recente identificazione del gene codificante per l'enzima beta secretasi (BACE) (1) ci consente di mettere a punto un saggio di *Real-time RT-PCR* per quantificarne l'espressione in prelievi autoptici provenienti da diverse aree cerebrali di soggetti affetti dalla malattia e in soggetti normali. In caso di differenze quantitative significative a livello dei tessuti cerebrali, si analizzerà l'espressione del gene anche in tessuti facilmente prelevabili per il possibile allestimento di un saggio biologico.

La curva standard di riferimento è preparata a partire da RNA totale estratto da cellule HEK293 diluito in tRNA di lievito alla quantità finale di 1 µg, secondo diluizioni scalari 1:4 (1000-250-62.5-15.6-3.9 ng). La retrotrascrizione viene allestita con *random primers* a partire da 1 µg di RNA. L'efficienza di ciascuna retrotrascrizione è monitorata amplificando il gene *housekeeping* GAPDH.

Il saggio finora allestito consente di identificare l'espressione del gene BACE a partire da 3.9 ng di RNA totale e la quantificazione risulta lineare per ciascun punto della curva standard

L'analisi preliminare su RNA totale estratto da tessuto cerebrale (ippocampo) di soggetti sani di controllo ha evidenziato livelli di espressione simili e pari a quelli ottenibili dall'amplificazione di 2 µg di RNA totale di HEK293. E' attualmente in corso lo studio di RNA totale estratto da altri campioni tissutali patologici e sani.

Bibliografia

(1) Vassar, R. et al. Science 286, 735-746 (1999).

M035

Martini G.¹, Padovani A.², Del Bono R.¹, Volpi R.¹, Borroni B.², Paoletti O.¹, Pontoglio S.¹, Colciaghi F.³, Cottini E.², Caimi L.¹

PLATELET AND ENDOTHELIAL ABNORMALITIES IN ALZHEIMER DISEASE

1) 2° Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche, Spedali Civili di Brescia (Italy)

2) II Divisione di Neurologia, Spedali Civili di Brescia (Italy)

3) Istituto di Scienze Farmacologiche, Milano (Italy)

Alzheimer disease (AD) leads to amyloid angiopathy due to A β 4 deposition in endothelium. Recent studies showed that AD may cause changes in platelet morphology and metabolism as well.

The aim of this study was to outline these alterations in AD patients through the determination of platelet amyloid precursor protein (APP) and the evaluation of plasma thrombomodulin (TM).

We measured F₁₊₂ thrombin fragments as indicator of hypercoagulability and β -tromboglobulin (β -Tg) to show platelet activation.

APP is the membrane protein from which the amyloid beta peptide (A β) is derived; A β forms the core of senile plaques in AD patients.

Normal endothelium surface expresses TM which binds to thrombin to activate protein C; soluble TM is a marker of endothelium cell activation.

30 patients were selected: 15 mild to moderate AD and 15 healthy controls.

APP was determined by Western Blot using monoclonal antibody 22C11: we calculated the *ratio* between the immunoreactivity of the higher MW form (130kDa) and the lowest forms (106 to 110 kDa). All coagulation parameters were determined by enzyme immunoassay (ELISA micro-plates). Imprecision was evaluated on control plasma.

A significant difference ($p < 0.001$) was found in platelets APP forms *ratio* (AD=0.34 \pm 0.16; C= 0.96 \pm 0.4) and in the concentration of TM (AD=14.4 \pm 3.1; C=9.96 \pm 1.15, $p < 0.001$) between patients and controls.

These findings may confirm that AD is associated with alterations in circulation, both at platelet and endothelial level; these abnormalities may reflect a vascular damage secondary to amyloid angiopathy.

We didn't find any hypercoagulability state in AD patients compared to controls as there were no differences in F₁₊₂ concentration between groups. Yet, there was no evidence of platelet activation measured by β -Tg in plasma.

This may suggest that AD related vascular damage does not increase thromboembolic risk in affected patients.

M036

De Lucia D., De Francesco F. §, Liotti F. §, D'Alessio D. #, Del Giudice V., Marotta R., Misto G., Laureano M., Rapacciuolo L., Citarella M., Quartucci R., Sorrentino M., Papa M.L. °, Dente B. *

THROMBUS PRECURSOR PROTEIN (TpP) QUALE NUOVO MARKER PREDITTIVO DI TROMBOFILIA NELLO STROKE DI NATURA CARDIOEMBOLICA

Ist. Patologia Generale ed Oncologia, II Università di Napoli; °Lab. Emostasi e Trombosi, Ospedale San Giovanni Bosco di Napoli; #Unità Cerebrovascolare, Azienda Ospedaliera 'G. Moscati' di Avellino; §Sezione Medicina Occupazionale e Igiene Industriale, Dip. di Biochimica e Biofisica, II Università di Napoli; *Lab. Patologia Clinica, Ospedale San Paolo di Napoli.

E' oramai accertato che uno degli eventi chiave nella formazione di un trombo intravasale è la trasformazione enzimatica del fibrinogeno circolante di natura solubile in polimeri di fibrina insolubili. Appena avvenuta la polimerizzazione del fibrinopeptide A, la trombina rimuove un piccolo peptide, il fibrinopeptide B. Questo polimero solubile è l'immediato precursore plasmatico della fibrina insolubile ed è perciò definito TpP (precursore proteico del trombo/thrombus precursor protein). Alti livelli di TpP sono stati ritrovati di recente nell'infarto del miocardio e nella angina instabile (Francis CW et al., 1992). Scopo del nostro studio era quello di dimostrare se anche nell'infarto cerebrale ischemico di natura atero-trombotica o cardioembolica vi fossero elevati livelli di TpP, capaci di evidenziare uno stato trombofilico. Abbiamo, perciò, selezionato 40 pazienti con stroke ischemico, 20 con diagnosi di stroke atero-trombotico e 20 con diagnosi di stroke cardio-embolico, e paragonato i livelli di TpP con 20 soggetti sani donatori di sangue, di uguale età, sesso, peso corporeo ed altezza. Il TpP è stato dosato con una metodica EIA (Italia Laboratori Boutey). Nei soggetti sani utilizzati come controllo e senza episodi di natura ischemica i livelli di TpP sono pari a 2.2 \pm 1.4 μ g/mL. Nei pazienti con stroke ischemico di natura aterotrombotica si osservavano valori significativamente elevati di TpP pari a 6.15 \pm 0.85 μ g/mL ($p < .001$, Mann Withney U-test), mentre nel gruppo di pazienti con stroke cardioembolico i livelli erano ancora più elevati (20.5 \pm 5.7 μ g/mL, $p < .0001$). Riteniamo che il TpP permetta la identificazione dei pazienti con incipiente trombosi in atto. Infatti, elevati livelli di TpP evidenziano la formazione di polimeri solubili di fibrina e perciò sono indice di trombosi in fase attiva. La diagnosi, quindi, precoce di trombosi cerebrale, con identificazione dei soggetti a rischio, dovrebbe ridurre significativamente la mortalità e la morbilità nei pazienti con stroke ischemico, e individuare sottogruppi di soggetti a più alto profilo di rischio trombofilico e quindi essere di grande ausilio nell'out-come clinico.