

M037

Papa M.L., Papasso F., Demurtas F., Pedone L., Torre S., Russo V., De Felice E.*, Del Giudice V.§, De Francesco F.§, De Lucia D.§

ATTIVAZIONE DELLA COAGULAZIONE E DELLA FIBRINOLISI NELLA INSUFFICIENZA RENALE CRONICA IN TRATTAMENTO EMODIALITICO.

Laboratorio di Emostasi e Trombosi, Ospedale San Giovanni Bosco di Napoli; *Servizio di Nefrologia ed Emodialisi, Clinica "Nostra Signora di Lourdes", Napoli; §Istituto di Patologia Generale ed Oncologia, 2 Università di Napoli, Napoli.

La patologia ischemica cardio- e cerebrovascolare rappresenta una complicanza frequente in pazienti uremici in trattamento emodialitico. Precedenti studi hanno evidenziato una disfunzione endoteliale nell'uremia cronica in trattamento emodialitico associata ad elevati valori dei markers di danno endoteliale (TM e von Willebrand). Scopo dello studio è verificare se un'attivazione della coagulazione parallela al danno endoteliale può contribuire all'aumentato rischio di eventi vascolari nei pazienti emodializzati.

Abbiamo studiato 40 pazienti uremici dializzati (20 F and 20 M, età media 55 ± 27.8 a.). Il gruppo di controllo era rappresentato da 40 soggetti sani scelti per sesso e per età. Sono stati eseguiti PT, APTT, Fg secondo le metodiche standard della coagulazione. Il Dimero-D, l'Antitrombina modificata (ATM), il frammento protrombinico 1+2 (F₁₊₂) ed il PAI-1 sono stati dosati con metodiche ELISA. La resistenza alla proteina C (PC) attivata è stata dosata utilizzando il metodo di Dahlback e tutti i soggetti resistenti sono stati sottoposti al test genetico per la ricerca della mutazione Q506 nel gene del FV.

Elevati livelli di F₁₊₂, ATM, Dimero-D, PAI-1 e Fg sono stati riscontrati nei pazienti rispetto al gruppo di controllo (3.2 ± 1.1 nmol vs. 0.9 ± 0.4 nmol, 18.4 ± 7.4 ng/mL vs. 5.2 ± 2.8 ng/mL, 904 ± 455 ng/mL vs. 175 ± 63 ng/mL, 37 ± 14 IU/mL vs. 16 ± 12 IU/mL, 413 ± 140 mg/dL vs. 280 ± 65.4 mg/dL; rispettivamente). Due pazienti presentavano una scarsa risposta alla PC attivata (5%), con una frequenza paragonabile a quella riscontrata nei soggetti di controllo. I nostri risultati confermano ancora una volta che il danno dell'endotelio vasale indotto dall'azione ripetuta delle dialisi innesca il meccanismo coagulativo e fibrinolitico. L'elevato grado di ipercoagulabilità riscontrato nei pazienti uremici in trattamento emodialitico è quindi correlabile all'aumentato rischio di complicanze ischemiche riscontrato.

M038

Paoletti O.¹, Martini G.¹, Del Bono R.¹, Volpi R.¹, Pontoglio S.¹, Bani P.¹, Caimi L.¹

EVALUATION OF THE PFA-100 SYSTEM IN THE DIAGNOSIS OF VON WILLEBRAND DISEASE

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

vW factor (vWF) carries factor VIII and promotes platelet adhesion to subendothelium and platelet aggregation under high shear stress flow. The diagnosis of vW disease (vWD) is based on the measurement of bleeding time, vWF antigen, vWF RCo, clottable FVIII, ristocetin induced platelet agglutination and vWF multimeric composition. In this study we tested the utility of the Platelet Function Analyzer, Dade-Behring (PFA-100), as a screening test for patients with vWD.

PFA-100 system creates an artificial vessel coated with collagen plus ADP or epinephrine; a platelet plug forms in it and the time needed to blood flow interruption is recorded (Closure time).

10 patients were selected: 4 children with prolonged aPTT, one haemophilic patient and 5 women: 4 of them had previously been diagnosed as vWD type I; two of them were pregnant. 10 healthy subjects were taken as controls. We tested platelet function by PFA-100 and measured plasma concentration of vWF antigen, vWF RCo, clottable FVIII, PT, PTT and fibrinogen in all patients and controls. The median closure time (Ct) in the 10 healthy subjects was 84" (range: 67-100) with collagen/ADP and 115" (range: 86-140) with collagen/epinephrine. The vWD patients showed significant prolonged median Cts ($p < 0.001$) compared to controls: collagen/ADP Ct was 149" (range: 108-240) and collagen/epinephrine Ct was 183" (range: 156-281). The haemophilic patient had low concordant FVIII levels and slightly prolonged Ct (108" and 153" Ct). In one of the pregnant patients we found increased levels of FVIII which could have masked the disease, whereas the Ct (192" for collagen/ADP and 209" for epinephrine) strongly suggested the diagnosis: this discrepancy might indicate that the PFA-100 system is more sensitive than factor VIII levels to show the pathology. These initial findings suggest that PFA-100 could be a good screening test for patients affected by vWD and platelet dysfunctions, even though we need more patients to confirm this statement: anyway, we found the System simple to use, less invasive than bleeding time and quick to perform together with other parameters needed for the diagnosis of vWD.

Jebeleanu G., Procopciuc L.M.

HIGH RISK OF VENOUS LEG ULCERS IN PATIENTS WITH FACTOR V LEIDEN MUTATION AND WITH FAMILY HISTORY OF THROMBOSIS

University of Medicine and Pharmacy "Tuliu Hatieganu"
Cluj-Napoca, Department Biochemistry,
6 Pasteur St., 3400 Cluj - Napoca, Romania

Resistance to activated protein C should be considered a risk factor for the development of venous leg ulcers [1]. In 95% of cases, resistance to activated protein C is caused by a single point mutation G to A at nucleotide 1691 (G1691A) in exon 10 of factor V gene, referred to as factor V Leiden (2,3,4)

The purpose of our study was to determine the prevalence of this mutation in the Romanian patients with venous leg ulcers and to identify the thrombophilic tendency in family members of patients with FV Leiden.

We analysed 20 cases with venous leg ulcers and 3 families of some patients identified with factor V Leiden mutation. The control group consisted of 10 healthy blood donors. The Leiden mutation is detected using the polymerase chain reaction, followed by digestion of the amplification product with 2U of the restriction endonuclease MnlI (5).

In our study 9 of 20 patients with venous leg ulcers, were found to have a factor V Leiden mutation. Our study also shows that there is a hypercoagulable state in all the family members of the index subjects with venous leg ulcers and factor V Leiden mutation. No individual of the control group was found to be heterozygous or homozygous for this mutation.

These findings confirm that the factor V Leiden mutation exists in Romanian population and represents a strong risk factor for venous leg ulcers.

Screening for factor V Leiden may be indicated in patients with venous leg ulcers and their family members.

BIBLIOGRAFIA

1. Pens D, Heit. JA., Pittelkow MR. J. Am Acad Dermatol 1997; 36: 616-20.
2. Zoller B, Svensson PJ, He X. Clin. Invest 1994; 94: 2521-2524.
3. Bertina RM, Koeleman PG, Koster T. Nature 1994;369:64-67.
Nature 1994; 369:64-67.
4. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Lancet 343: 1362, 1994.
5. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stamfer MU, Eisenberg PR, Miletich JP. N Engl J Med. 1995;332:912-7.

Micelli M., Paparella D.°, Centonze G., Vitale L.°, Stragapede A., Fiore T.°, De Luca Tuppusti Schinosa L.°

ANTICORPI ANTI EPARINA/FATTORE PIASTRINICO 4 IN PAZIENTI CARDIOCHIRURGICI

Laboratorio di Coagulazione, Az. Osp. Policlinico di Bari;
°Dipartimento di Emergenza e Trapianti d'Organo (DETO)
- Università di Bari

Introduzione: L'uso prolungato o l'esposizione ripetuta all'eparina può indurre la formazione di anticorpi contro il complesso Eparina-Fattore Piastrinico 4 (HPF4) con conseguente trombocitopenia di tipo immune (HIT tipo II) o, in casi più rari, trombosi arteriose o venose. I pazienti sottoposti a interventi cardiocirurgici sono a rischio di sviluppare HIT tipo II sia perché già precedentemente esposti ad eparina (angiografia e/o trattamento), sia per le elevate dosi di eparina necessarie durante l'intervento in circolazione extracorporea (CEC), sia per lo stress a cui sono sottoposte le piastrine a causa delle caratteristiche dell'intervento (ipotermia, inserzione di valvole ecc.).

Scopo dello studio: Abbiamo perciò voluto verificare la formazione di anticorpi anti HPF4 prima e dopo interventi in CEC e correlarli con il numero di piastrine.

Materiali e metodi: Sono stati studiati 86 pazienti sottoposti a CEC per varie patologie. La valutazione degli anticorpi anti HPF4 (IgG + IgM) ai tempi: prima (T1), dopo 6 giorni (T2) e a distanza di un mese dall'intervento, è stata effettuata con metodo ELISA (TGI) su piastrine coattate con il complesso Eparina/Fattore Piastrinico 4. I risultati sono espressi come valori di densità ottica (OD). Sono considerati positivi i valori superiori a 0.400 OD.

Risultati: Le medie delle determinazioni ai tempi T1, T2 e T3 (0.217 ± 0.241 , 0.269 ± 0.207 e 0.225 ± 0.187) hanno mostrato una differenza significativa. I titoli di anticorpi anti HPF4 sono risultati significativamente più elevati ai tempi T2 rispetto a T1 ($p = 0.01$) e a T3 ($p = 0.02$). Il 21 % dei dati per un totale di 11 pazienti è stato trovato positivo in almeno una delle tre occasioni: il 7% al tempo T1, il 9.3 % al tempo T2 e il 6.4% al tempo T3. I livelli di anticorpi anti HPF4 a T1, T2 e T3 sono risultati rispettivamente: 0.890 ± 0.350 , 1.070 ± 0.450 e 0.980 ± 0.460 . Nessuno degli 11 pazienti ha sviluppato i sintomi tipici dell'HIT tipo II. Non è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra il titolo di anticorpi anti HPF4 e il numero di piastrine.

Conclusioni: Il nostro studio conferma che un'elevata percentuale di pazienti sottoposti ad alte dosi di eparina durante interventi cardiocirurgici sviluppa anticorpi anti HPF4 sebbene nel nostro studio nessuno di essi abbia sviluppato sintomi tipici dell'HIT tipo II. Rimane da definire l'importanza clinica della presenza isolata di anticorpi anti HPF4.

Bibliografia: Warkentin TE. Heparin induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. Thromb Haemost 1999; 82(2):439-447

M041

Trogia G., Gregori M.

IL DOSAGGIO DEL D-DIMERO: EVIDENZA PER LA PROFILASSI ANTI-TROMBOTICA DOPO INTERVENTI ORTOPEDICI SUGLI ARTI INFERIORI

Lab. Analisi, Casa di cura "Stella del Mattino" – Fondaz. Orizzonte Speranza – ONLUS – Boves, CN

Introduzione: La concentrazione plasmatica del D-Dimero è elevata nel 97% di pazienti con TVP e TEP, un valore normale esclude un evento tromboembolico acuto (valore predittivo negativo)(1), eliminando nel 30% dei casi procedure diagnostiche più laboriose e costose. Senza adeguata profilassi, l'incidenza della TVP è di circa il 50% dopo interventi di chirurgia ortopedica sull'anca e ginocchio, ma anche in corso di terapia la lisi del trombo si ha solo nel 20-30% dei casi. Nel 40% dei pazienti con TVP si ha TEP, con mortalità dal 10 al 20%. Il valore del DD si eleva dopo chirurgia ortopedica di > 4 volte il dosaggio precedente l'intervento (2-3). La soglia di normalità del test va corretta in funzione dell'età (4). Secondo la FCSA la terapia anti-coagulante orale (TAO) è opportuna in corso di TVP e TEP per almeno 3 mesi (5).
Pazienti e Metodi: Nel periodo 1.7-15.12.1999 abbiamo esaminato tutti i 100 pazienti ricoverati per riabilitazione intensiva in seguito a chirurgia ortopedica, in media a 15-20 gg dall'intervento, così suddivisibili: 30 m, 70 f; fasce di età: > 75 aa = 34 paz.; 60-74 aa = 44; 40-59 aa = 17; < 40 aa = 5; per patologia: 75 paz. con Artroprotesi d'anca; 3 con Endoprotesi d'anca; 6 con Artroprotesi di ginocchio; 16 con sintesi metallica in seguito a fratture degli arti inferiori. E' stato dosato il DD con la metodica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) rapido a test singolo (VIDAS-DD, bio-Mérieux, Francia), oltre che i normali tests coagulativi, la ATIII, le piastrine. **Risultati:** In tutti i 100 paz. il DD è risultato nettamente elevato oltre i valori normali corretti per età ($p < 0,01$), con nesso di causalità diretto col recente intervento ortopedico. I valori di DD sono suddivisibili nelle seguenti fasce: 700-1500 ng/ml = 20 paz.; 1501-2500 = 27 paz.; 2501-3500 = 20 paz.; 3501-5000 = 18 paz.; >5000 = 15 paz. Tutti i paz. all'ingresso erano in terapia con Eparina calcica o Eparine a basso p.m., ai dosaggi ottimali per 20 gg, quindi a Defibrotide per 1 mese, nel 70% dei casi associato a bassi dosi di ASA (100mg) per 2 mesi. Tuttavia nei casi con elevati valori di DD > 3500 ng/ml e/o di sintomatologia clinica di TVP e fattori di rischio (obesità, DM, Varici, edema infiltrato, anamnesi di TVP, ecc.) in 40 paz. si è instaurata TAO con Warfarin a dosaggio secondo PT, con decremento del DD fino a valori normali in 3 mesi dall'intervento. **Conclusioni:** Il DD è quindi il test discriminante per impostare una corretta profilassi delle TVP dopo chirurgia ortopedica.

1) PERRIER A., Lancet 1999 Jan 16, 353: 190195; 2) LEVY G., Presse Méd. 1991, 20, 34, 1647-1650; 3) VILLE D., Réunion GEHT 6-7.4.1995; 4) HAGER K., Gerontol., 1995, 41, 159-165; 5) FCSA, Guida all'impiego degli anticoagulanti orali, n.1, Aprile 1991.

M042

Cancellieri E., Vagni A., Mainardi E., Farina U.*, Montanelli A.

TVP ILIACO-FEMORO-POPLITEA DOPO 58 GIORNI DI TERAPIA CON CONTRACCETTIVI ORALI DI III GENERAZIONE

Laboratorio Analisi e *Chirurgia Vascolare – A.O. Ospedale Maggiore di Crema (Cr)

INTRODUZIONE La trombofilia è un insieme di quadri fisio-patologici che riconoscono nel 50% dei casi un'eziopatogenesi di natura genetica, ma che trovano in alcune condizioni acquisite di aumentato rischio i fattori scatenanti degli eventi trombo-embolici.

La diagnostica di laboratorio è impegnata nel mettere a punto protocolli di screening a favore delle condizioni a rischio ed al contempo protocolli diagnostici al verificarsi degli eventi acuti.

CASO CLINICO Una giovane donna (19 anni) ha presentato una TVP in sede iliaco-femoro-poplitea sx dopo 58 giorni di assunzione di terapia estro-progestinica con un preparato di III generazione contenente desogestrel. La diagnosi è stata posta mediante ultrasuonografia Doppler. L'applicazione del protocollo diagnostico di laboratorio (previsto in caso di evento acuto e pre terapia anticoagulante: PT; PTT; Fibrinogeno; ATIII; PC; PS; RAPC; LAC; Omocisteina) ha consentito di mettere in evidenza una aumentata Resistenza alla PC, confermata dal successivo accertamento di una condizione di omozigosi per FV Leiden.

Le indagini anamnestiche e biochimiche sui familiari hanno fornito le seguenti informazioni: parente di II grado con IMA in età < 45 anni (iperomocisteinemia); genitori e fratello eterozigoti per FV Leiden.

OSSERVAZIONI Ancora una volta le indagini anamnestiche familiari sono purtroppo risultate positive solo a posteriori.

Il ruolo giocato dal desogestrel conferma quanto acquisito nella recente letteratura.

Pare ormai non più prorogabile l'introduzione della valutazione della resistenza alla proteina C nei protocolli di screening pre terapia con contraccettivi orali.

Le linee guida consigliano di eseguire gli accertamenti di laboratorio per lo studio di trombofilia almeno dopo 3 mesi dall'evento acuto; la nostra esperienza vuole mettere in evidenza il ruolo diagnostico di un protocollo che, elaborato e condiviso con i clinici, viene posto in essere al verificarsi di un evento acuto, prima dell'adozione delle misure terapeutiche.

M043

Lando G.*, Zoppi F.*, Caimi T.M. §, Figini A.*, Mostarda G. §, Baudo F. §, Marocchi A.*, Patrosso M.C.*

POLIMORFISMI DELLA SUBUNITÀ CYP2C9 DEL CITOCROMO P450 IN PAZIENTI IN TRATTAMENTO ANTICOAGULANTE

Lab. di Biochimica Clinica ed Ematologia, Modulo di Trombosi ed Emostasi, Ospedale Ca' Granda Niguarda, Milano

La presenza di alcuni polimorfismi genetici nella subunità CYP2C9 del citocromo P450 (CYP2C9*1 è l'allele normale) permette di classificare i pazienti che vengono trattati con anticoagulante in pazienti che metabolizzano normalmente (NM) e pazienti che metabolizzano poco (PM) il farmaco. Soggetti con la variante allelica CYP2C9*2 (Cys144, Ile 359) e CYP2C9*3 (Arg144, Leu359) hanno un ridotto metabolismo della Warfarina. Il nostro obiettivo è stato valutare se vi fosse una associazione significativa tra un particolare allele o genotipo ed il ridotto metabolismo della Warfarina e/o dell'Acenocumarolo. I soggetti inclusi nello studio sono stati così classificati: a) 108 pazienti (54 PM e 54 NM) trattati con Warfarina, b) 56 pazienti (28 PM e 28 NM) trattati con Acenocumarol e c) 148 individui di controllo scelti a caso nella popolazione. I PM assumevano una dose media di 7 mg/settimana, mentre i NM una dose media di 25 mg/settimana. Tutti i soggetti sono stati accoppiati per sesso, età, farmaco ed INR, non assumevano farmaci che interferissero con il trattamento e avevano test di funzionalità epatica nella norma. Le tre varianti alleliche sono state individuate mediante PCR e RFLP.

Conclusioni: 1) Si è riscontrata una forte associazione tra l'allele CYP2C9*3 e la sensibilità al trattamento anticoagulante solo per quanto riguarda la Warfarina; 2) l'allele CYP2C9*1 è meno frequente nei LM vs NM ($p < 0.001$); 3) Il genotipo CYP2C9*1*1 è poco rappresentato nei LM ($p < 0.001$); 4) Il genotipo CYP2C9*3*3 è assente nei NM; 5) La combinazione dei due alleli nel genotipo CYP2C9*2*3 è fortemente associata ai pazienti LM ($p < 0.0001$); 6) Non si sono riscontrate differenze significative alleliche e/o genotipiche, in pazienti trattati con dosaggio basso o standard di Acenocumarol.

M044

De Lucia D. (1), Maisto G. (1), Del Giudice V. (1), Marotta R. (1), De Francesco F. (1), Rapacciuolo L. (1), Papa M.L. (2) And Dente B. (3)

RELATION BETWEEN MARKERS OF HYPERCOAGULABILITY AND PRO C GLOBAL AS SCREENING TEST FOR THROMBOPHILIA

(1) Institute of General Pathology, Laboratory of Haemostasis and Thrombosis; II University of Naples. (2) Hemophilia and Thrombosis Center, Pellegrini Hospital; Naples. (3) Laboratory of Clinical Pathology; San Paolo Hospital, Naples.

Thrombosis is a multicausal disease. In most cases two or more risk factors both genetic and acquired are necessary before thrombotic event occurs. It is mandatory to have a screening assay which is able to recognize this combination of defects. ProC Global (Dade Behring) is a coagulometric assay measuring the prolongation of an APTT induced by activation of Protein C (PC) in the sample. The results are correlated with levels of homocysteine (HPLC with fluorimetric detection) and the FVIII:C and FII (coagulometric determination; IL). We have investigated 150 patients with hyperhomocysteinemia (> 16 mmol/L), aged 51.5 ± 15.5 years, FVIII:C > 155 IU/dL in 80 patients, FII > 117.5 IU/dL in 17 patients; both factors are elevated in 11 patients. patients with FV R506Q mutation and PC/PS deficiencies are excluded from the study. It is possible to detect patients with above mentioned combination of the three risk factors in the ProC Global assay. The sensitivity as function of mNR and NR varied between 92.3% (mNR with cut-off 0.75) and 78% (NR with cut-off 0.80). The sensitivity for the combination of the two risk factors homocysteine and elevated FVIII:C levels is 81.5% (mNR) and 76% (NR), for homocysteine and elevated FII the sensitivity is 85% and 74%, respectively. Among investigated subjects (1455) with thrombophilia we found a high percentage of patients with combined defects. The ProC Global as general screening tests for the whole PC-pathway is able to recognize other thrombogenic risk factors additionally, especially the combination of high levels of homocysteine, FVIII:C and FII.

M045

De Lucia D. (1), Maisto G. (1), Del Giudice V. (1), Marotta R. (1), De Francesco F. (1), Rapacciuolo L. (1), Papa M.L. (2) and Dente B. (3)

RESISTANCE TO ANTICOAGULANT ACTION OF PROTEIN C CORRELATES WITH ACA IGG AND ANTI β 2GPI IGG

Institute of General Pathology, II University of Naples; (2) Hemophilia and Thrombosis Center, Pellegrini Hospital; (3) Laboratory of Clinical Pathology, San Paolo Hospital, Naples.

Resistance to anticoagulant action of protein C (APCR) may be due not only to FV R506Q mutation but also to immunologic disorders (APCR phenotype). In order to evaluate whether the presence of LAC syndrome, ACA (IgG and M) and anti β 2GPI (IgG) antibodies could be associated with the APCR phenotype, we studied 30 LAC patients diagnosed according to SSC ISTH criteria. Twenty-five out of thirty had a previous history of venous (15) or arterial brain (7) thrombosis or fetal losses (3). We carried out the original and the modified (plasma diluted 1:5 in FV depleted plasma) APCR APTT based assays (IL). We found that the prevalence of APCR original phenotype was significantly higher in patients with ACA (+) IgG and anti β 2GPI (+) (14/15) than in those patients ACA (-) IgG and anti β 2GPI (-) (0/15). The ACA (+) IgG and anti β 2GPI (+) group showed a mean APCR ratio significantly lower than the ACA (-) IgG and anti β 2GPI (-) group ($p < .001$ and $p = .002$ with the original and modified technique, respectively). The APCR phenotype was lost in 7/15 and showed borderline values in the other 8 patients using the modified technique. A linear correlation between ACA IgG vs original APCR ratio ($r = -0.75$) was found. However, when the analysis was limited to those patients with an abnormal APCR ratio, the correlation was increased ($r = -0.86$). We also found a linear correlation when plotting log anti β 2GPI vs log APCR ratio. The authors feel that the APCR ratio phenotype seems to be strongly associated to ACA IgG and anti β 2GPI. The inverse correlation between APCR ratio and the titer of ACA and anti β 2GPI, suggests an effect of these antibodies on the APC phospholipid-dependent inactivation of FVa.

M046

Sciacovelli L.¹, Zaninotto M.², Plebani M.^{1,2}, Panteghini M.³ (per il Gruppo di Studio SIBioC-SIMeL Marcatori di Lesione Miocardica)

IL PROGRAMMA NAZIONALE DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ SIBioC-SIMeL PER I MARCATORI DI LESIONE MIOCARDICA

¹Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto TV; ²Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova; ³Laboratorio Analisi Chimico Cliniche I, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

I nuovi marcatori biochimici proteici (CK-MB massa, mioglobina e troponine) rivestono una sempre maggiore importanza per la diagnosi, la valutazione della prognosi e la predizione dell' "outcome" dei pazienti con sindrome coronarica acuta. Questo crescente interesse ha favorito lo sviluppo di numerosi metodi e strumenti per la loro determinazione, ma ha anche evidenziato la necessità di armonizzare i dati ottenuti con le differenti metodologie. Spesso infatti, nonostante i miglioramenti nella automazione dei metodi, si osservano significative discrepanze fra i risultati ottenuti per lo stesso analita con metodi diversi. Il programma di valutazione esterna di qualità (VEQ), promosso dal Gruppo di Studio "Marcatori di Lesione Miocardica" e gestito dal Centro di Ricerca Biomedica, fornendo informazioni relativamente ai differenti metodi utilizzati nella pratica ed alle prestazioni dei laboratori partecipanti, assume quindi un ruolo determinante per poter raggiungere significativi miglioramenti nella concordanza generale. Oltre agli aspetti puramente analitici di generazione del risultato, questa VEQ ha inoltre esteso la valutazione agli aspetti legati all'interpretazione del risultato stesso, mettendo in evidenza come lo stesso valore numerico possa assumere un significato diverso relativamente ai limiti di riferimento e ai livelli decisionali riportati dai diversi laboratori.

I risultati relativi all'anno 1999 (60 laboratori partecipanti) dimostrano che i CV inter-laboratorio relativi alle diverse metodiche hanno valori significativamente differenti in relazione al metodo utilizzato: dal 6% (Access) al 45% (Opus) per la troponina I, dal 6% (Stratus) al 32% (Opus) per la CK-MB e dal 2% (Stratus) al 25% (Opus) per la mioglobina. Si è riscontrata, inoltre, una notevole variabilità nella selezione dei limiti di riferimento (troponina I: 15 intervalli diversi per 46 laboratori che li dichiarano; troponina T: 4 per 6; CK-MB: 9 per 44; mioglobina: 16 per 51) e dei livelli decisionali (troponina I: 8 valori diversi per il danno miocardico e 9 per l'infarto acuto su 34 laboratori che li dichiarano; troponina T: 3 valori diversi per il danno e 2 per l'infarto su 4), anche nel caso venga usato lo stesso metodo. La partecipazione alla VEQ è quindi necessaria per controllare e migliorare le prestazioni analitiche ed, al limite, come ausilio per valutare l'opportunità di mantenere o sostituire i metodi in uso.

M047

Rulli A., Angelici G., El Zohbi B., C. Romano, Nubile G.

ITRAGUARDI ANALITICI D'IMPRECISIONE (Ta) E LA CHIMICA SECCA

Laboratorio Analisi SS Annunziata, Via dei Vestini Chieti 66013

L'inserimento di analizzatori di chimica secca, con gara service all'inizio del 1998, Vitros 950 e Vitros 250 della ditta Johnson e Johnson, ci ha indotto a rivalutare la variabilità analitica.

Dopo un primo periodo di necessario avviamento, nel quale la imprecisione e la inaccuratezza sono state valutate con controlli forniti dalla stessa ditta (Verify 1 e 2), la fase successiva è stata quella di implementare un controllo interno per l'imprecisione ed un controllo "esterno allargato" per l'inaccuratezza, utilizzando controlli a due livelli della Ditta Biorad.

La tabella mostra i CV, di alcuni analiti, nel primo trimestre 1999 e i traguardi analitici d'imprecisione (1).

Analita	CV		Ta
	Liv. 1	Liv. 2	
Glucosio	1.3	0.9	3.05
Bun	2.6	2.1	5.8
Ast	4.7	3.4	11.5
Alt	5.3	2.4	5.8
Amilasi	9.4	2.3	4.85
Ggt	1.6	2.4	6.1
Proteine t.	2.1	2.4	2.3
Na	1.8	1.8	0.3
K	1.5	1.4	2.3
Colestes. t	2.2	2.2	2.65
Trigliceridi	2.3	1.9	11
Etc.			

La nostra prima valutazione dei sistemi Vitros è sicuramente positiva, infatti i traguardi analitici d'imprecisione, proposti da società scientifiche europee e non, sono per la maggior parte degli analiti al di sopra dei CV trovati. La valutazione delle performance dei sistemi richiede comunque un più ampio spettro temporale, obiettivo da noi prefissato per una più chiara valutazione.

1) Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. Allowable imprecision for laboratory tests based on clinical and analytical test outcome criteria. Clin Chem 1994; 40: 1909-14.

M048

Guerra E., Ferrero C.A., Carobene A., Zeggio P., Ceriotti F., Paroni R., Arcelloni C., Bonini P.A.

PRESTAZIONI DEI LABORATORI PARTECIPANTI AL PROGRAMMA VEQ PROLARIT SIBIOC BIORAD VALUTATE CON CRITERI BASATI SULLA VARIABILITA' BIOLOGICA

Istituto Scientifico H S Raffaele, Laboratorio di Standardizzazione per la Chimica Clinica, 20132 Milano, ITALY

Il programma PROLARIT SIBioC BIORAD di Valutazione Esterna di Qualità in Biochimica Clinica, per ogni risultato, oltre a calcolare il tradizionale scarto z assegna al laboratorio un punteggio definito in base al rapporto tra scarto del risultato rispetto alla media del gruppo di metodo ed Errore Totale ammesso (Et_a). Quest'ultimo è stato definito preliminarmente sulla base delle variabilità intra ed interindividuali riportate in letteratura, (C. Fraser et al. Ann Clin Biochem 1997; 34:8-12) procedendo però a qualche aggiustamento nei casi in cui lo stato dell'arte risulta o troppo distante o già ampiamente entro i limiti desiderati. Per ogni componente è stata calcolata la percentuale di laboratori che, nel corso del primo anno del Programma, hanno riportato scarti dal valore atteso inferiori a Et_a ($\% < Et_a$).

	Ambito Et_a	% $< Et_a$		Ambito Et_a	% $< Et_a$
Cloruri	$\pm 2,5\%$	36%	Proteine Tot	$\pm 5,0\%$	69%
ALP	$\pm 15,0\%$	40%	ALT	$\pm 15,4\%$	72%
Creatinina	$\pm 7,5\%$	48%	Fosfato	$\pm 10,0\%$	72%
IgM	$\pm 15,0\%$	50%	Ferro	$\pm 15,4\%$	75%
Transferrina	$\pm 7,5\%$	50%	Acido Urico	$\pm 11,1\%$	79%
Calcio	$\pm 3,5\%$	52%	Colesterolo	$\pm 8,4\%$	80%
Albumina	$\pm 6,1\%$	56%	Glucosio	$\pm 7,5\%$	80%
IgG	$\pm 7,5\%$	57%	Potassio	$\pm 5,0\%$	81%
AMY	$\pm 15,0\%$	58%	GGT	$\pm 20,8\%$	83%
AST	$\pm 14,0\%$	60%	Bil Totale	$\pm 25,0\%$	83%
CHE	$\pm 10,0\%$	62%	Trigliceridi	$\pm 15,5\%$	90%
IgA	$\pm 15,0\%$	67%	Urea	$\pm 15,0\%$	95%
Sodio	$\pm 2,5\%$	68%			

I risultati ottenuti evidenziano come non per tutti i laboratori il raggiungimento dei traguardi analitici sia un obiettivo realistico. Infatti per Cloruri, Fosfatasi Alcalina e Creatinina la percentuale di laboratori in grado di ottenere risultati entro il rispettivo Et_a risulta inferiore al 50%. D'altra parte per 5 componenti la percentuale di partecipanti con risultati mediamente all'interno dell'ambito valore atteso $\pm Et_a$ risulta superiore all'80%. In alcuni casi questo comportamento è reso possibile soprattutto da traguardi analitici particolarmente ampi (Trigliceridi, Bilirubina Totale, GGT), in altri da una variabilità analitica particolarmente contenuta (Potassio).

M049

Carobene A., Ferrero C.A., Guerra E., Zeggio P., Cerotti F., Bonini P.A.

IMPATTO DEL TIPO DI MATERIALE SUI RISULTATI NEI PROGRAMMI DI VEQ PER IL COLESTEROLO

Istituto Scientifico H S Raffaele, Laboratorio di Standardizzazione per la Chimica Clinica, 20132 Milano, ITALY

Il massimo errore ammissibile per la determinazione del Colesterolo in base ai criteri della variabilità biologica è stato fissato a $\pm 8.4\%$. Il raggiungimento di questo traguardo risulta difficile ma lo è ancor di più il riuscire a verificarlo. I materiali di controllo utilizzati nei programmi di VEQ presentano infatti problemi di commutabilità che possono introdurre dei bias rendendo così difficile la valutazione di accuratezza. Nel corso del 2° invio del Programma di VEQ PROLARIT SIBIOC BIORAD sono stati inviati ai laboratori partecipanti insieme ai due materiali liofilici (C e D) altri 2 materiali liquidi congelati (P1 e P2). La assegnazione del valore atteso di Colesterolo ai sieri di controllo è stata eseguita con il metodo di riferimento (Abell-Kendall in accordo con il CDC). In tabella riportiamo gli scarti % dal valore di riferimento e i CV% interlaboratorio ottenuti sui diversi materiali divisi in base ai sistemi analitici utilizzati.

Gruppo (n°)	Siero C (173 mg/dL)		Siero D (282 mg/dL)		Siero P1 (167 mg/dL)		Siero P2 (346 mg/dL)	
	Bias	CV	Bias	CV	Bias	CV	Bias	CV
Hitachi (35)	-0,6%	4,7%	-0,7%	5,3%	-0,5%	3,4%	1,3%	3,3%
Vitros (6)	-6,8%	2,5%	-0,5%	3,5%	-7,9%	3,0%	-4,2%	4,9%
Beckman (9)	-13%	5,5%	-12%	5,1%	-4,9%	3,9%	-0,1%	3,8%
Merck (5)	0,8%	7,0%	2,1%	4,1%	2,4%	5,4%	5,4%	3,2%
IL (8)	-8,8%	8,2%	-5,8%	6,5%	-0,4%	3,3%	1,3%	4,3%
Cobas (6)	-7,5%	7,8%	-7,0%	10%	-2,1%	4,0%	2,5%	5,6%

Dalla tabella si può notare come, se si esclude il gruppo VITROS, i CV% interlaboratorio dei materiali liquidi sono sempre più contenuti rispetto a quelli dei liofilici. Se si analizzano gli scarti dal valore target ottenuti con i diversi tipi di materiale si può notare come, mentre per i gruppi Hitachi e VITROS non ci sono differenze rilevanti, per Beckman, IL e Cobas si osservano marcati bias negativi con i materiali liofilici che si riducono notevolmente con quelli liquidi. Al contrario il gruppo Merck presenta bias positivi più accentuati nei materiali liquidi. All'interno dei dati relativi allo stesso materiale osserviamo, a seconda dei sistemi analitici utilizzati, differenze di bias comprese, per il Siero C, tra -13.0% (Beckman) e $+0.8\%$ (Merck). E' difficile capire se la differenza osservata può essere attribuibile ad un errore di calibrazione del sistema o ad un problema effettivo di commutabilità del materiale. In queste condizioni è importante che la classificazione dei laboratori venga effettuata in base al sistema analitico utilizzato e non per principio analitico come avviene in molti programmi di VEQ.

M050

Secchiero S., Zardo L., Bonvicini P., Plebani M.

PROGRAMMA DI VEQ PER BIOCHIMICA GENERALE SU CAMPIONI DI URINA: VALUTAZIONE COMPLESSIVA DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DEI PARTECIPANTI

Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Questo Programma, in corso da tre anni, segue il disegno organizzativo del Programma di VEQ per Biochimica Clinica su siero, gestito sin dal 1985 dal CRB e continuamente rivisto nei contenuti.

Lo schema si articola in 4 esercizi di due campioni ciascuno da analizzare per 22 analiti: Na, K, Cl, Ca, P, Mg, glucosio, urea, creatinina, urato, proteine tot., amilasi, idrossiprolina, microalbumina, catecolamine, cortisolo, aldosterone, 5-HIAA, VMA, HVA.

La classificazione dei metodi viene effettuata dal responsabile del Programma, mediante l'analisi dei foglietti illustrativi dei kit diagnostici forniti dai partecipanti. I risultati, inviati sotto forma di referto in uso nel laboratorio con l'indicazione dei rispettivi intervalli di riferimento, vengono rielaborati in modo da fornire un rapporto periodico con la valutazione di ogni singola prestazione analitica ed una valutazione complessiva del laboratorio. Gli obiettivi di qualità per i singoli analiti sono definiti in termini di indici di scostamento (IS) dal valore assegnato (mediana dei risultati per gruppo omogeneo di metodo), rapportato ad un coefficiente di variazione assegnato, ricavato dallo stato dell'arte. In funzione del valore assoluto dell'indice di scostamento (ISA), le prestazioni vengono classificate in ottime (<50), buone (50-100), accettabili (101-150), non accettabili (>150).

La prestazione complessiva del laboratorio viene valutata in termini di MISA cioè come media di tutti i valori di ISA < 150 , indipendentemente dal costituente e dal campione, alla quale vengono sommati le prestazioni non accettabili (PNA), gli outliers (OUT) e gli errori riscontrati nel referto (es. unità di misura errata) nel modo seguente: $Media\ ISA < 150 + f(x \cdot nPNA + y \cdot nOUT + z \cdot nErrori)$, dove $f = n$ di risultati attesi/n di risultati forniti e $x, y, z =$ pesi attribuiti.

Al ciclo 1999 hanno partecipato 80 laboratori tra pubblici e privati (81% veneti, 19% di altre 7 regioni).

La prestazione complessiva dei laboratori nei 4 esercizi ha fornito i seguenti risultati: 3-9% ottima; 41-59% buona; 22-37% accettabile; 7-20% non accettabile.

Pertanto, anche se più della metà dei Partecipanti ha ottenuto prestazioni complessive più che soddisfacenti, ad ogni esercizio una percentuale non trascurabile di laboratori ha fornito una prestazione ritenuta non accettabile. Ad influire su questo risultato sono spesso gli errori riscontrati sui referti; infatti una percentuale di laboratori compresa tra il 17 ed il 33% ha effettuato almeno un errore.

M051

Cattozzo G., Monteggia M., Pettini P., Melzi d'Eril G.

MISURA DELLA LIPASI CON DUE METODI: COMMUTABILITÀ DEI MATERIALI DI RIFERIMENTO CON I SIERI DA PAZIENTI

Ospedale Del Ponte-A. O. Fondazione Macchi, Varese
Università dell'Insubria, Varese

La misura della lipasi (EC 3.1.1.3) nel siero viene largamente utilizzata per la diagnosi ed il monitoraggio della pancreatite acuta. Per tale analisi sono disponibili vari metodi, che possono fornire risultati differenti. Nel processo di standardizzazione, la variabilità tra metodi dei materiali di controllo e di calibrazione (materiali di riferimento, MR) non deve differire da quella dei sieri da pazienti (SP), cioè tali materiali devono essere commutabili. In questo lavoro si è valutata la commutabilità di alcuni MR del commercio in due coppie di metodi, ciascuna delle quali comprendeva il metodo che utilizza il substrato 1,2-digliceride (DG) ed, a turno, uno di due metodi basati sull'utilizzo del substrato cromogenico 1,2-O-dilauril-rac-glicerolo-3-glutaril-(6-metilresorufin) estere. Venivano analizzati 98 SP e 29 MR con DG (Sentinel, Milano) e con due metodi con substrato cromogenico, rispettivamente indicati come CrA (Roche, Milano) e CrB (Sentinel). Tutte le analisi venivano eseguite con un analizzatore Hitachi 912 (Roche) a 37° C. Per valutare la commutabilità dei MR, i risultati forniti da CrA e da CrB nell'analisi dei SP, a turno, venivano confrontati (asse y) con i risultati forniti da DG (asse x) e si valutava la dispersione dei SP attorno alla retta di regressione (non-parametrica) calcolando la deviazione standard dei residui ($S_{y/x}$); quindi si valutava lo scostamento dei MR dalla retta di regressione dei SP: se tale scostamento era superiore a $3 S_{y/x}$, i MR venivano considerati non-commutabili. Nel confronto tra CrA e DG, l'analisi della regressione dava $y = 0.87x + 13.4$ U/L ($S_{y/x} = 14.6$ U/L); in questa coppia di metodi 3 MR su 29 (10 %) risultavano non-commutabili. Nel confronto tra CrB e DG, l'analisi della regressione dava $y = 0.43x + 11.0$ U/L ($S_{y/x} = 6.6$ U/L) e 12 MR su 29 (41 %) risultavano non-commutabili. In entrambi i confronti, il grado di non-commutabilità dei MR appariva correlato con la concentrazione della lipasi. Per valutare l'effetto della non-commutabilità dei MR sulla calibrazione, i risultati forniti da CrA venivano ricalcolati utilizzando come calibratori, a turno, un MR commutabile ed un MR non-commutabile, con il rispettivo valore assegnato mediante DG. Quando CrA veniva calibrato con un MR non-commutabile, le differenze tra valori forniti da CrA (ricalibrato) e valori forniti da DG aumentavano vistosamente e 49 campioni (50 %) venivano erroneamente classificati come patologici. In conclusione, anche nel caso della lipasi è necessario valutare la commutabilità dei MR destinati all'impiego come calibratori, o nei programmi di VEQ.

M052

Bonvicini P.¹, Metus P.², Tocchini M.³

OBIETTIVI PER L'IMPRECISIONE, L'ACCURATEZZA E L'ERRORE ANALITICO TOTALE IN PROGRAMMI DI CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

²Laboratorio di Analisi, Ospedale Civile, Menaggio (Como)

³Laboratorio di Analisi, Ospedale Torrette, Ancona

La scelta degli obiettivi può essere fatta sulla base di criteri diversi. Quella che attualmente sembra godere dei maggiori consensi è basata sulla variabilità biologica intra e inter individuale. Le principali limitazioni all'uso di questo criterio sono legate a due aspetti: 1) i dati sulla variabilità biologica sono in alcuni casi contrastanti e/o limitati e 2) i limiti derivati sono a volte troppo "stretti" o troppo "ampi" rispetto allo stato dell'arte delle prestazioni analitiche.

Per i limiti riguardanti l'imprecisione analitica proponiamo una scelta arbitraria basata su un compromesso tra lo stato dell'arte analitico e la variabilità biologica intraindividuale. Ad esempio, quando lo stato dell'arte dell'imprecisione è migliore di quella richiesta secondo il modello della variabilità biologica i limiti *ottimali* e *desiderabili* possono essere scelti mediante un opportuno percentile dello stato dell'arte mentre l'imprecisione *minima accettabile* corrisponde ai tre quarti della variabilità biologica intraindividuale.

Quando invece i limiti calcolati secondo il modello della variabilità biologica sono troppo stretti l'imprecisione *minima accettabile* può essere stabilita scegliendo un opportuno percentile dello stato dell'arte. Ad esempio, per il sodio, il cui CV intraindividuale è 0,6%, l'imprecisione *minima accettabile* secondo il modello della variabilità biologica è 0,5%, mentre noi proponiamo di usare come limite il valore di 1,0%, che rappresenta il 50° percentile dello stato dell'arte.

Analogamente, anche lo scostamento dal valore "bersaglio" accettabile secondo il modello della variabilità biologica può essere spesso troppo ampio. Idealmente, nel controllo di qualità interno, lo scostamento dovrebbe essere zero in quanto l'obiettivo è quello di mantenere lo stesso errore sistematico. In questo caso i limiti possono essere stabiliti sulla base della differenza statisticamente significativa tra il valore "bersaglio" e la media di un definito numero di risultati.

Per calcolare i limiti per l'errore analitico totale può essere usata la stessa formula proposta da Fraser et al, sostituendo i corrispondenti valori per l'imprecisione e lo scostamento = $k \times$ imprecisione + scostamento; ove k è 1,65 o 2,33 per 95% o 99% di probabilità.

M053

°Borsotti M., °Quercioli M., #D'Amario C., #Balucanti F., §Tocchini M., §Manso E., ^Peirone C. ^Sensini A.

ABRUZZO, MARCHE, TOSCANA ED UMBRIA: L'ESPERIENZA DI QUATTRO REGIONI NELLA GESTIONE DI V.E.Q. IN CHIMICA CINICA, COAGULAZIONE, EMATOLOGIA E MICROBIOLOGIA.

°Centro Reg.Riferimento per il C.Q. – A.O.Careggi (Firenze);

Laboratori Regione Abruzzo

§ Laboratori Regione Marche

^ Laboratori Regione Umbria

La Regione Toscana ha istituito nel 1990 il Centro Regionale di Riferimento per il Controllo di Qualità in Laboratorio con lo scopo di gestire direttamente i Programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) per i Laboratori pubblici e privati.

Nel 1998 è stata stipulata una convenzione fra la Regione Toscana e le Regioni Marche ed Umbria, con vari intenti di collaborazione reciproca, in base alla quale anche i Laboratori Pubblici di queste Regioni partecipano agli stessi programmi di VEQ, gestiti da questo Centro in ottemperanza al D.P.R. 4.1.97. Nel 1999 la convenzione è stata estesa anche alla Regione Abruzzo. In questo momento vengono effettuati nel Centro programmi di VEQ di varie Branche che interessano oltre 300 laboratori.

Un alto numero di partecipanti permette di avere una buona significatività statistica anche per dati prodotti con strumenti e metodiche di nuova introduzione o di scarsa diffusione regionale. Inoltre la partecipazione, di tutti i laboratori di una regione, agli stessi programmi di VEQ, permette di effettuare elaborazioni personalizzate e mirate per un confronto sia interregionale che intraregionale, secondo l'esigenze ed i suggerimenti dei referenti scientifici delle varie regioni, realizzando così un unico programma di VEQ interregionale.

Solo con il contributo di tutte le componenti è possibile avere un miglioramento non solo dei risultati analitici ma anche di tutto ciò che è correlato alla prestazione di Laboratorio (Valori di Riferimento, Unità di Misura, ecc.).

M054

Stocchi O., Bianchi G., Carrera F.

DETERMINAZIONE DI HbA_{1C}: DUE METODI A CONFRONTO.

U.O. Laboratorio Analisi Ospedale di Urbino
ASL N.2 URBINO (PU)

L'emoglobina glicosilata (HbA_{1C}) rappresenta il marcatore più importante per il controllo a medio e lungo termine del metabolismo glucidico nei pazienti diabetici. Scopo di questa ricerca è lo studio dell'attendibilità analitica del metodo elettroforetico per la determinazione dell'HbA_{1C}.

A tale proposito la determinazione di HbA_{1C} è stata eseguita in doppio, sulla stessa popolazione-campione, con tecnica elettroforetica e con HPLC, ritenuto a tutt'oggi metodo di riferimento.

Questa ricerca è stata effettuata nel quadrimestre settembre-dicembre 1999 presso l'UO Laboratorio Analisi Ospedale di Urbino ASL N.2.

Sono stati esaminati 105 campioni di sangue (prelievo con tecnica vacutainer su provette con EDTA_{K₃}) provenienti da pazienti diabetici iscritti al CAD dell'ASL N.2 di Urbino. Per la metodica cromatografica è stato utilizzato il Sistema HPLC Variant, *Biorad*; per la metodica elettroforetica è stato utilizzato il Sistema Hydragel Hemoglobin Glycated, *Sebia Ciampolini*.

Le determinazioni analitiche sono state tutte effettuate in parallelo nella stessa giornata.

Sono state eseguite prove per la valutazione dell'attendibilità analitica sia per il metodo Sebia che per il Biorad espresse in CV% rispettivamente:

ripetibilità: 3,4 e 2,3; *riproducibilità*: 7.5 e 2.3; *accuratezza*: (solo Biorad) -3,3; *correlazione*: $r=0,91$
 $y=1.16x+0,15$; *test della sensibilità* alla Base di Schiff.

Da quanto sopra emerge l'affidabilità anche del metodo elettroforetico nella determinazione dell'HbA_{1C}. Nonostante l'ottima correlazione, è in dubbio che i valori ottenuti col metodo elettroforetico risultano sistematicamente più elevati di quelli con il metodo HPLC.

Nathan D.M. et al., The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay. N. Eng. J. Med. 310, 341-346, 1984.

M055

Mercadanti M., Ivaldi G.¹, Ripamonti M.², Capra M.³,
Monica C.

Hb RALEIGH ELUTING AS HEMOGLOBIN F USING HPLC: A FAMILY'S STUDY

¹Lab. Analisi Az. Osp. Parma; ¹Lab. Microcitemia Osp.
Galliera Genova; ²SIT Trento; ³SIT Monza.

The Hemoglobin (Hb) Raleigh [β 1 (NA1) Val \rightarrow Ac-Ala] is a rare hemoglobin variant that is not pointed out by electrophoresis at pH 8.5, nevertheless is isolated by cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC) (Bio-Rad VariantTM). Recent publications reveal an interference of this Hb variant in Hb A_{1c} dosage. The case that we found out (thirty years old woman, blood donor, healthy), showed a peak plotting like Hb F by HPLC Variant system; while the alkaline electrophoresis did not point-out any pattern in Hb F zone, this pattern appeared in acid electrophoresis. The same peak was pointed-out at examination of the family trait as regards the father and the brother assay, while the mother sample was normal. In all subjects the hemocrome parameters and reticulocytes number were normal. Two years later the HPLC analysis was unchanged.

Further investigations with isoelectric focusing and globin chain separations by reversed phase HPLC (RP-HPLC) identified this Hb variant as heterozygote condition. These were followed by RP-HPLC separation of the peptides. Aminoacid analysis indicated a mutation Val \rightarrow Ala corresponding to Hb Raleigh.

Our case proves:

- the Hb Raleigh behaves in chromatography as Hb F in all examined subjects, unlike other notes quoted in literature an interference with Hb A_{1c};
- the stability of chromatographic pattern in time;
- importance of a correct analytical approach, 1° level, to discriminate the several fractions;
- the advantage of HPLC method for detection of electrophoretically silent variants with altered hydrofobicity.

Reference

Landini B. And Jeppson J.O.: Hemoglobin 17:303, 1993.

M056

Veronesi M., Tucci E., Nubile G.

INDIVIDUAZIONE DI DUE CASI DI EMOGLOBINE VARIANTI MEDIANTE IL METODO BIO-RAD VARIANT UTILIZZATO PER IL DOSAGGIO DI HbA_{1c}

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche,
Ospedale G. Bernabeo Ortona (CH)

Utilizzando il Bio-Rad Variant Haemoglobin Testing System, per il dosaggio dell'emoglobina A_{1c}, negli oltre 500 pazienti che annualmente vengono inviati presso il nostro laboratorio dal centro anti-diabetico sito presso la medesima struttura ospedaliera, abbiamo individuato due casi che presentavano anomalie alla lettura del cromatogramma; nel primo si trattava di un soggetto di sesso maschile in cui si evidenziava un picco sovrapposto alla zona dell'A0 con una percentuale pari al 42.5%, mentre nel secondo si trattava di un soggetto di sesso femminile in cui il picco relativo alla zona dell'HbF era pari all'11%. I due pazienti non presentavano alcuna sintomatologia evidente e l'esame emocromocitometrico effettuato risultava nella norma. Campioni di sangue di entrambi sono stati sottoposti ad analisi mediante il Bio-Rad Variant utilizzando il tempo a 6.5 minuti. Dall'analisi dei tracciati è risultato: nel primo paziente, la presenza di un picco corrispondente ad una HbS pari al 38.7%, nel secondo paziente invece era evidente una HbF pari all'11.2%. Per una conferma definitiva dei risultati, è stata eseguita un'elettroforesi su acetato di cellulosa a pH 9.6. Lo scopo di questo lavoro è quello di evidenziare come il sistema di analisi in HPLC utilizzato dal Bio-Rad Variant Haemoglobin Testing System (Clin Lab Haematol 1998 Feb;20(1):31-40), possa rivelarsi particolarmente efficace anche come strumento di screening per la diagnosi delle emoglobine varianti in pazienti con sintomatologia assente e valori ematologici nella norma.

M057

Volpi R.¹, Martini G.¹, Del Bono R.¹, Paoletti O.¹, Pontoglio S.¹, Pigozzi M.G.², Baisini O.², Lanzini A.², Caimi L.¹

SERUM TRANSFERRIN RECEPTOR AS A MEASURE OF HEREDITARY AND SECONDARY IRON OVERLOAD

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

2) I Medicina, Spedali Civili di Brescia (Italy)

Transferrin receptor controls the uptake of extracellular transferrin-bound iron into cells.

In plasma it is present as a soluble form (sTfR); its concentration depends on intracellular iron levels and on the rate of erythropoiesis.

The aim of this study was to outline its diagnostic utility in hereditary haemochromatosis (HH) and secondary iron overload due to transfusional therapy. sTfR was determined by BN II nephelometer (N Latex sTfR, Dade-Behring).

32 subjects were studied: 10 healthy controls, 10 untreated HH (three H63D homozygotes, six C282Y homozygotes, one compound heterozygote) and 12 patients undergoing transfusional therapy (10 β -thalassemia, one Pure Red Cell Aplasia and one myelophthisic aplasia). Imprecision was evaluated on 2 control sera (high and low) and 3 pools (inter-assay CVs: 0.7 to 1.12%).

Due to the extended rate of erythropoiesis, sTfR was up to 4 fold increased in β -thalassemia compared to controls (5.35 mg/dL vs 1.26 mg/dL; $p < 0.01$, 95%CI: 1.4-6), while it was 6 fold lower (0.21 mg/dL) in patient affected by PRCA.

Unpaired Student's *t*-test showed significative low levels of sTfR in HH (mean: 0.94 mg/dL; SD: 0.21) compared to β -thalassemia ($p < 0.01$; 95%CI: 1.7-6.3) and to controls ($p < 0.01$; 95%CI: 0.08-0.5). The parameter was higher in C282Y homozygotes than in H63D homozygotes (1.02 mg/dL, SD: 0.2 vs 0.84 mg/dL, SD: 0.03); the three younger patients had low median levels of ferritin (139 μ g/dL) which could have masked the diagnosis, whereas median sTfR concentrations were already below normal values (0.88 mg/dL).

sTfR has been reported to be a sensitive indicator of tissue iron deficiency. It appears to be a valuable tool, along with ferritin and transferrin saturation, in assessing the functional iron status of HH as well, especially in young affected people whose hepatic iron may not have reached a stage where Ft is suspiciously high; yet, it could be a useful indicator of total erythroid activity and become a new parameter for the management of β -thalassemia.

M058

Belloli S., Ruggeri G., Faustini M., Benini C., Viola F.*, Scolari F.*, Albertini A.

THE USEFULNESS OF THE SERUM TRANSFERRIN RECEPTOR AND FERRITIN LEVELS IN DETECTING IRON DEFICIENCY.

3 Laboratorio Analisi; Divisione di Nefrologia, Azienda Spedali Civili di Brescia

Transferrin receptor is a transmembrane glycoprotein derived from erythroid precursor in the bone marrow. Its serum concentration (sTfR) provides a quantitative measure of total erythropoietic activity and an indication of functional iron deficiency. It can be used in combination with other measures of iron status such as the serum ferritin to give a more complete picture of an individual's iron status than any parameter alone.

The aim of the study was to evaluate the diagnostic efficiency of sTfR and sTfR/log ferritin (TfR-F Index) in the assessment of iron depletion.

The study included: 67 apparently healthy control subjects (41 male and 26 female) and 42 patients diagnosed with iron deficiency anaemia (21 male and 21 female).

All samples were assessed hematologically (Hb, MCV, HT) and by conventional iron status parameters.

We used a newly introduced automated chemiluminescent immuno-assay method on a Liason analyzer to measure the sTfR concentration (Nichols Advantage® - Byk Sangtec).

Imprecision was evaluated on 3 control sera and 1 pools. Intra-assay Cvs: 1.5 to 2.1%; inter-assay Cvs: 3.8 to 5.7%. Mean recovery spiked into patient samples is 98%.

The mean values for sTfR were 2.68 ± 0.53 mg/L (CI 95%: 2.51-2.81) and 4.9 ± 2.6 mg/L (CI 95%: 4-5.7) in the normal controls and in the iron deficient patients, respectively.

The TfR-F ratio (calculated by logarithmic transformation of the ferritin value) significantly improved diagnostic sensitivity and specificity, as compared to either sTfR or ferritin alone (1, 0.94 vs 0.73, 0.82). The cutoff limits based on the efficiency curves were 2.8 mg/L for sTfR and 2.2 for TfR-F index.

The results indicate that sTfR assay is an effective tool for assessing iron status. The combined use of sTfR and ferritin provides the highest sensitivity and specificity for detecting iron deficiency.

Souminen P et al. *Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits.*

Blood, 92;8, 1998: 2934-2939

M059

Novembrino C.¹, Bamonti F.¹, De Vecchi A.², Fasano A.¹, De Franceschi M.¹, Naggi P.¹, Pomati M.¹, Finazzi S.², Ciani A.¹, Rosina M.³, Maiolo A.T.¹

MONITORAGGIO DELLO STATUS MARZIALE IN PAZIENTI UREMICI DOPO BOLO DI FERRO

¹Dpt. Scienze Mediche, Università di Milano, ²Divisione Nefrologia e Dialisi, Ospedale Maggiore-IRCCS; ³Istituto Scienze Biomediche, Università di Milano, Ospedale Sacco; Milano, Italy

Una corretta valutazione dello status marziale è essenziale per un adeguato inquadramento diagnostico e terapeutico dei pazienti uremici. Lo stato marziale dovrebbe indicare da un lato se il paziente dispone di una quantità di ferro sufficiente a raggiungere e/o mantenere la quota prefissata di emoglobina (Hb) e dall'altro segnalare l'eventuale sovrasaturazione dei depositi. A tutt'oggi, non esiste un singolo test di laboratorio che permetta di ottenere queste informazioni.

Scopo: per una valutazione più attendibile dello status marziale dei pazienti uremici individuare il/i test diagnostici più indicativi tra quelli attualmente disponibili.

Pazienti e metodi: 10 pazienti in dialisi peritoneale (M/F 6/4; età media 57±5 anni), ancora sideropenici dopo terapia con ferro orale, venivano supplementati con ferro parenterale (bolo di ferro gluconato, 300 mg) e monitorati bisettimanalmente per un mese.

Su campioni di sangue periferico prelevati a digiuno, venivano valutati: emocromo e ferritina eritrocitaria (Ery-Fer) su sangue intero; sideremia, capacità totale ferro-legante (TIBC), % saturazione, ferritina (S-Fer) e recettore solubile della transferrina (sTfR) su siero. Le concentrazioni di Ery-Fer (su lisati eritrocitari deleucocitati) (1) e di S-Fer erano determinate con il metodo automatizzato immunoenzimatico IMx Ferritin assay (Abbott). I livelli di sideremia e TIBC erano determinati con metodo fotometrico (BAYER), mentre quelli di sTfR con metodo immunoenzimatico su piastra QuantiKine assay (R&D Systems).

Per l'analisi statistica era utilizzato il test di Wilcoxon.

Risultati: espressi come media ± SD:

analiti	basale	+15 giorni	+30 giorni
Hb (g/dL)	8.9 ± 0.9	9.4 ± 0.8	9.7 ± 1.1
Ematocrito (%)	26.4 ± 0.8	28.1 ± 1.1	29.3 ± 0.9
% saturazione	25 ± 2.5	26 ± 1.7	24 ± 2.2
sTfR (µg/mL)	2.1 ± 1.2	2.2 ± 1.3	2.0 ± 1.1
S-Fer (ng/mL)	75 ± 8	150 ± 11	120 ± 12
Ery-Fer (ng/mL)	73 ± 10	192 ± 15*	248 ± 19*

*p<0.02 vs basale

Discussione: Dalla valutazione comparativa dei diversi parametri diagnostici emerge che l'indicatore più attendibile delle reali scorte di ferro risulta essere la ferritina eritrocitaria che correla con i valori dell'Hb e dell'ematocrito.

(1) C. Novembrino et al., Clin Chem Lab Med, 37: S506 (1999)

M060

Bamonti-Catena F.¹, Pomati M.¹, Naggi P.¹, De Franceschi M.¹, Novembrino C.¹, Rosina M.², Cavalca V.³, Ciani A.¹, Maiolo A.T.¹

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI LIVELLI EMATICI DI FOLATO: STUDIO RETROSPETTIVO IN DIVERSE PATOLOGIE

¹Dpt. Scienze Mediche, Ospedale Maggiore-IRCCS, Servizio Ematologia Diagnostica, ²Istituto Scienze Biomediche, Ospedale Sacco, ³Istituto Cardiologia, Università di Milano, Milano, Italia

La carenza di folato è associata a severe alterazioni dell'ematopoiesi, a malformazioni congenite, a disturbi neurologici e ad aterosclerosi. Il meccanismo che regola l'omeostasi del folato è ben noto; grazie al lento metabolismo del globulo rosso, il folato intraeritrocitario (Ery-F) si può considerare il migliore indicatore dei depositi della vitamina e quindi un indice stabile ed affidabile dello status del folato. Tuttavia la sua determinazione è generalmente meno richiesta dai clinici rispetto a quella del folato sierico (S-F).

Scopo: analisi epidemiologica retrospettiva, e relativa valutazione, dei livelli ematici di folato ottenuti presso il nostro laboratorio nell'arco di tre anni.

Materiali e Metodi: Dei 2610 soggetti testati dal 1996 al 1998, in 1251 casi (48%) sono stati dosati sia l'Ery-F sia l'S-F. La distribuzione dei pazienti era la seguente: 389 con macrocitosi, 268 con patologie ematologiche, 204 con neuropatie, 92 con patologie gastrointestinali e 162 con uremia; 136 soggetti, senza evidenti segni patologici, costituivano il gruppo di controllo.

I livelli ematici delle vitamine sono stati determinati, con metodo immunoenzimatico semiautomatizzato Stratus (Dade), su campioni di siero e di sangue in EDTA (1). Il trattamento dei dati è stato effettuato con il test di Wilcoxon e l'analisi della componente principale standardizzata.

Risultati: In relazione alle patologie non si evidenziavano differenze significative dei livelli ematici di folato. La valutazione globale dei dati, escludendo il 10% dei pazienti "supplementati" con vitamine, evidenziava, nel 58% dei casi, una "concordanza" tra S-F ed Ery-F (entrambi nel rispettivo intervallo di riferimento) e, nel 32%, una "discordanza" (Ery-F nell'intervallo di riferimento ed S-F al di fuori o viceversa). Inoltre, nel gruppo dei "concordanti" non si evidenziava alcuna correlazione tra S-F ed Ery-F ($y=29.59x+492.2$; $r=0.58$).

Discussione: La concentrazione di S-F, sebbene comunemente più richiesta dai clinici, non riflette lo stato vitaminico con sufficiente accuratezza. Riteniamo che questo test possa essere utilizzato nello screening iniziale, mentre un addizionale dosaggio di Ery-F dovrebbe essere obbligatorio per una diagnosi più mirata di patologie associate ad alterato metabolismo della vitamina e per valutare l'effetto della supplementazione di folato.

(1) F. Bamonti et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 35: 781-785 (1997)

M061

Bamonti-Catena F.¹, Bucciante G.², Patrosso C.³, Novembrino C.¹, Coghi E.², Lando G.³, De Franceschi M.¹, Baragetti I.², Maiolo A.T.¹

MTHFR ED OMOCISTEINA: STUDIO IN PAZIENTI EMODIALIZZATI

¹ Dpt. Scienze Mediche, Università di Milano, Ospedale Maggiore-IRCCS; ² Div. Dialisi e Nefrologia, Azienda Ospedaliera S. Gerardo di Monza, Presidio Bassini, Cinisello Balsamo (MI); ³ Lab. Biochimica Clinica ed Ematologia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Una mutazione comune della metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR), enzima chiave nella rimetilazione dell'omocisteina (Hcy) a metionina, rende tale enzima termolabile e può comportare alterazioni dei livelli plasmatici dell'Hcy, inducendo un precoce sviluppo di aterosclerosi anche in pazienti uremici dopo supplementazione con folato (1).

Per valutare la potenziale interazione tra la mutazione termolabile C677T della MTHFR, i livelli dell'Hcy e quelli delle vitamine correlate, è stato effettuato uno studio trasversale su 55 pazienti in emodialisi trisettimanale. Di essi, 27 (M/F 12/15, età media 62±2 anni) erano sottoposti a supplementazione cronica con folato e Vit. B12 per presenza di megaloblastosi, mentre 28 (M/F 19/9, età media 60±2) non erano trattati. Nessun paziente assumeva farmaci interferenti con il metabolismo dell'Hcy. I livelli ematici di Hcy e delle vitamine erano determinati, con metodiche immuno-enzimatiche IMx (Abbott), su campioni di sangue, prelevati all'inizio della prima seduta settimanale, dopo 12 ore di digiuno. La presenza della variante termolabile C677T era caratterizzata mediante RFLP. I risultati, espressi come media ± SE, erano analizzati mediante test t di Student per dati non appaiati e regressione multivariata. Risultati dei pazienti non trattati/trattati (*p<0.05):

Vit B12 762±72.2/1200±73.6 pmoli/L (VR 200-700)*

S-Fol 13.2±1.8 / 17.7±1.9 nmoli/L (VR 7-40)

Ery-Fol 1511±155/2176±127 nmoli/L (VR 500-1464)*

Hcy 51.1±8.3/ 31.7±3.6 μmoli/L (VR < 11.7)*.

La prevalenza della mutazione, simile a quella della popolazione di controllo, era: 32% "wild type", 49.7% eterozigoti, 18.9% omozigoti. La presenza della mutazione in omozigosi era associata ad un significativo aumento dei livelli di Hcy, di seguito riportati per pazienti non trattati/trattati:

"wild type" 36.9±4.37/21.1±1.61 μmoli/L (p<0.05)

eterozigoti 48.9±13.81/31.9±4.67. μmoli/L (p<0.05)

omozigoti 87.7±25.39/36.8±13.5 μmoli/L (p<0.05).

Le concentrazioni delle vitamine erano nella norma.

La riduzione dei livelli di Hcy ottenuta dopo supplementazione con folato era maggiore nei pazienti omozigoti (52%) che negli eterozigoti (35%) o nei genotipi normali (43%), indicando pertanto un ruolo anche del fattore genetico sull'iperomocisteinemia dei pazienti emodializzati.

(1) G. Bucciante et al., Haematologica, **83**:10-17 (1998)

M062

Lanfranchi A., Verardi R., Berta S., Porta F.*, Ascari E.^, Trainini L.^, Albertini A.

UN NUOVO TEST PER LA DIAGNOSI DI LINFOISTIOCITOSI ERITROFAGICA

III Laboratorio Analisi, Spedali Civili, Brescia *Clinica Pediatrica, Spedali Civili, ^II Laboratorio, Spedali Civili, Brescia

La linfoistiocitosi eritrofagica (HLH) è patologia grave che, se non trattata, è invariabilmente fatale. I bambini affetti sono nella maggior parte lattanti, infatti la malattia si presenta nei primi mesi di vita, anche se vi sono casi di bambini affetti nella prima decade di vita. I sintomi di presentazione non sono di facile inquadramento dal momento che mimano una sepsi. Infatti la forma si presenta con febbre, coagulopatia, pancitopenia, iperbilirubinemia, elevazione dell'LDH, ipertrigliceridemia, organomegalia. L'HLH è una malattia ereditaria, il cui difetto genico è stato recentemente clonato. Vi è una forma famigliare ed una sporadica, Per porre la diagnosi è necessario che il bambino presenti i criteri clinici sopracitati, ma centrale per la diagnosi è l'evidenziazione di cellule istiocitarie eritrofagiche nel midollo osseo. La presenza di cellule istiocitarie eritrofagiche nel midollo non è reperto patognomico, ma accanto al corteo sintomatologico, diviene conclusivo per HLH. Cellule istiocitarie eritrofagiche sono presenti anche nell'artrite reumatoide, nella tubercolosi secondaria. Tuttavia l'evidenziazione di cellule istiocitarie eritrofagiche midollari richiede una attenta valutazione dei preparati istologici che non sempre sono informativi.

I bambini affetti da HLH presentano una iperattivazione istiocitaria caratterizzata da elementi che non hanno atipie, ma infiltrano organi e tessuti. Nel sospetto diagnostico è possibile indagare il difetto genico, ma i tempi tecnici di analisi non sono brevi.

Riportiamo un nuovo test per l'evidenziazione delle cellule istiocitarie eritrofagiche nel midollo osseo. In due bambini che non presentavano le caratteristiche sintomatologiche e cliniche tipiche dell'HLH, la diagnosi differenziale comprendeva l'anemia aplastica e la mielodisplasia. Per questo motivo è stato effettuato un aspirato midollare e sono stati coltivati i precursori emopoietici ed espanso lo stroma midollare. Mentre le colture midollari risultavano nel range di normalità, le colture allestite per valutare l'attività stromale dimostravano sorprendentemente un'assenza di cellule aderenti, mentre nel sovrannatante si evidenziava in entrambi i casi la presenza di una popolazione omogenea di istiociti in attiva eritrofagocitosi. Le condizioni di coltura hanno selezionato l'espansione selettiva delle cellule istiocitarie caratteristiche della malattia.

M063

Diani G.P.,* Bruno-Franco M*, Benati L.*, Novazzi F,*
Porta C., Bressan MA.

UTILIZZO DI UN NUOVO METODO PER IL DOSAGGIO DELL'HbA1c (METODO IMMUNO-CHIMICO SU ANALIZZATORE ADVIA 1650)

*Servizio Analisi Chimico-Cliniche e Servizio di Pronto Soccorso ed Accettazione
I.R.C.C.S. Policlinico S.Matteo, 27100 Pavia.

L'emoglobina glicata (HbA1c) può essere considerata un fattore memorizzante della concentrazione di glucosio nel sangue per un periodo significativamente lungo (2-3 mesi); il suo valore, pertanto, fornisce al clinico una indicazione relativa al tasso glicemico medio del paziente nel periodo di tempo trascorso dall'ultima visita di controllo. Questo dato è particolarmente utile nella pratica clinica, anche in urgenza, in quanto, come noto, i valori di glicemia e glicosuria possono non essere significativi o falsati da fattori intercorrenti.

In questo lavoro abbiamo confrontato un metodo cromatografico di routine (HPLC-Menarini HA8140) con un innovativo metodo immunometrico, adattato su autoanalizzatore ADVIA 1650Bayer.

Sono stati presi in considerazione 103 campioni selezionati casualmente tra quelli della routine. Il prelievo è stato raccolto in provette contenenti EDTA-K3 ed analizzato sui due strumenti. Il metodo immunometrico fornito dalla ditta Bayer utilizza un anticorpo monoclonale specifico basato sull'inibizione dell'agglutinazione di particelle di lattice rivestite da numerose copie della porzione immunoreattiva di HbA1c. La metodica prevede un pretrattamento per ottenere la lisi delle emazie (diluizione 1:41 con reagente denaturante specifico ed incubazione di almeno 5 min. a temperatura ambiente). Inoltre, è possibile la conservazione dei campioni per due settimane se congelati a -20°C; in questo caso i campioni, scongelati a temperatura ambiente, vengono testati allo stesso modo dei campioni appena raccolti.

I valori di riferimento sono stati ottenuti da 96 campioni di soggetti non diabetici ($x=5,20\% \pm 0,90\%$)

L'analisi statistica tra i due metodi è stata eseguita utilizzando la regressione di Passing e Bablock con intervallo di confidenza del 95%, che ha fornito la seguente equazione: $y= 1.399+1.0060x$ con $r=0.998$

La correlazione con il metodo cromatografico in uso si è quindi rivelata significativa nonostante i due metodi siano basati su principi analitici totalmente diversi, indicando una sensibile accuratezza ed affidabilità della nuova metodica testata.

I valori ritrovati sui campioni precedentemente testati, sottoposti a congelamento e riprocessati, si sono rivelati sovrapponibili.

Larsen ML et al. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1990.

M064

Scimè-Degani V., David O., Leone D.*, Parodi M.I.*, Baffico M.*, Baldi M.*, Arrigo P.***, Scagni P.***, Ivaldi G.*

IL LABORATORIO E LA BIOINFORMATICA NELLA DIAGNOSI DELLE VARIANTI DELL'EMO-GLOBINA CON AUMENTATA AFFINITA' PER L'OSSIGENO

Lab. Patol. Clinica, O.I.R.M.-S. Anna, TO; *Lab. Genetica Umana-Microcitemia Ospedali Galliera, GE; **Ist. Circuiti Elettronici, CNR, GE; ***Centro Microcitemia, Dip. Oncoimmunoematol, Università, TO

Quasi 150 diverse mutazioni del gene β globinico sono associate alla produzione di emoglobine (Hb) con aumentata affinità per l'ossigeno (O_2). L'espressione fenotipica caratteristica è l'eritrocitosi, che può variare in rapporto al meccanismo molecolare di base, a fenomeni allosterici, al pH e a fattori ambientali. Sono noti fenotipi diversi quasi sempre caratterizzati da valori aumentati dell'ematocrito e della quantità di Hb e da eritrocitosi; circa la metà di queste varianti Hb sono silenti alla migrazione elettroforetica e non presentano sintomatologia clinica. Affinità aumentata è stata documentata per alcune varianti instabili, in questi casi si possono avere fenomeni compensatori con produzione di fenotipi atipici.

Negli ultimi due anni abbiamo potuto osservare e caratterizzare sei diverse varianti (Hb Gàmbara, Hb Bologna-St. Orsola, Hb Trento, Hb Bumbury, Hb Heathrow, Hb Johnstone) in altrettante famiglie nelle quali uno o più componenti presentavano gradi variabili di eritrocitosi non sempre associata a valori elevati dell'ematocrito; le prime tre non erano mai state documentate in precedenza. Abbiamo anche studiato in questi anni diverse famiglie con varianti Hb instabili (Hb Köln, Hb Genova, Hb Shepherds Bush, Hb Abruzzo) che presentano aumentata affinità per l' O_2 .

Partendo da tali esperienze, avendo modo di osservare sempre più frequentemente soggetti con aumentata massa eritrocitaria, nella maggior parte dei casi indotta da cause non genetiche, abbiamo voluto prendere in considerazione un protocollo diagnostico che prevede le seguenti fasi: 1) *momento anamnestico*, importante per l'orientamento dei processi analitici (presenza o ricordo di malattie, disfunzioni cardio-vascolari e polmonari, abitudini di vita, fumo, attività sportive, uso di sostanze o farmaci particolari, familiarità etc.) 2) *approccio analitico essenziale* comprendente: esame emocromocitometrico, dosaggio del 2,3 difosfoglicerato (DPG), P_{50} (1 punto in ossimetria), eritropoietina, ricerca di frazioni Hb e reticolociti. 3) *fase analitica di conferma* con studi biochimici, funzionali, molecolari. Questa ultima fase potrà anche avvantaggiarsi di strumenti *bioinformatici*, cioè di mezzi efficaci ed efficienti per il supporto decisionale, facilitando sia la pianificazione dell'attività sperimentale, sia l'interpretazione dei risultati di laboratorio.

H. Wajcman and F. Galactéros. Abnormal hemoglobins with high oxygen affinity and erythrocytosis. Hematol. Cell Ther., 38: 3, 305-312, 1996.

M065

Scimè-Degani V., Pavanetto D.*, De Angelis S.*, Parodi M.I.*, Leone D.*, Pascotto D.*, Ivaldi G.*

PERSISTENZA EREDITARIA DI Hb F (HPFH): PROTOCOLLO MINIMO PER LA VALUTAZIONE E L'ESPRESSIONE FENOTIPICA DELLA MUTAZIONE G γ -158 (C \rightarrow T).

Laboratorio Analisi, O.I.R.M.-S. Anna, Torino
*Laboratorio Genetica Umana-Microcitemia Ospedali Galliera, Genova.

Quando l'emoglobina fetale (Hb F) è presente in quantità superiore all'1% in assenza di difetti talassemici o di altri stress midollari, si può ipotizzare una causa genetica genericamente classificata come persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH). A tutt'oggi si conoscono almeno 70 diversi difetti molecolari riconducibili a HPFH. Tali difetti possono anche presentarsi associati alla beta talassemia e contribuire a compensare la ridotta produzione di catene β globiniche.

Recentemente abbiamo predisposto un protocollo minimo per la determinazione dell'Hb F, per l'individuazione dell'eventuale presenza del difetto molecolare più frequente nella nostra popolazione quale causa di HPFH rappresentato dalla mutazione nel promoter del gene G γ in -158 (C \rightarrow T) associata al polimorfismo *XmnI* e per discriminare gli incrementi di Hb F dovuti a cause non ereditarie.

Abbiamo basato lo studio su un gruppo di 128 soggetti, 10 normali di controllo, e 118 con Hb F variabilmente aumentata per cause diverse. Il dosaggio è stato eseguito mediante HPLC "dedicato" comparandolo ai metodi tradizionali e alla determinazione dopo separazione delle catene γ in RP-HPLC. Il polimorfismo *XmnI* è stato cercato utilizzando il metodo dell'amplificazione genica con "primers" specifici e successiva digestione enzimatica. I trait β eventualmente associati sono stati individuati secondo protocolli standard e la caratterizzazione molecolare eseguita mediante Reverse Dot Blot (RDB).

Abbiamo potuto concludere che:

- il dosaggio mediante cromatografia "dedicata" rappresenta il metodo più corretto e riproducibile per valutare l'Hb F;
- l'HPFH prodotta dalla mutazione G γ -158 (C \rightarrow T) presenta una penetranza incompleta e una espressività variabile sia inter che intrafamiliare, e risulta sicuramente sottostimato nella popolazione italiana;
- il protocollo si dimostra utile nella diagnosi differenziale in gravidanza quando si presentano incrementi più o meno fisiologici dell'Hb F.

Préhu C. et Al. Determination of Hb F levels: the routine methods. *Hemoglobin* 22: 5-6, 459-467, 1998.

M066

*Cerutti A., °Custodi P., *Panarello G., *Duranti M., *Piziali G.

UN CASO DI PSEUDOTROMBOCITOSI DA CRIOGLOBULINEMIA

*Laboratorio Analisi, °Divisione di Medicina Interna, Ospedale S. Biagio - 28845 Domodossola (VB)

Scopo: Studio di un caso di pseudotrombocitosi.

Metodi: L'esame emocromocitometrico è stato eseguito sullo strumento Advia 120 (Bayer); gli strisci di sangue periferico sono stati colorati secondo May-Grumwald-Giemsa.

Risultati e conclusioni. Nel settembre 1999 si è presentato al nostro laboratorio per controlli ematochimici il paziente L.E., maschio di 61 anni. All'esame emocromocitometrico si rilevava un'importante trombocitosi ($2155 \times 10^9/L$), cui corrispondeva un quadro clinico caratterizzato da ipertensione e ripetuti episodi di epistassi, che ha portato a formulare l'ipotesi diagnostica di trombocitemia essenziale. Tuttavia l'esame microscopico dello striscio di sangue periferico non confermava il dato strumentale della piastrinosi. Dato che il campione non presentava anomalie di carattere ematologico (microcitemia, frammenti di leucociti e/o di eritrociti) che potessero giustificare un aumento spurio della conta piastrinica, si è pensato ad una pseudotrombocitosi da crioglobulinemia¹, che veniva confermata dai seguenti risultati sperimentali:

1. La conta piastrinica si normalizzava ($230 \times 10^9/L$) se effettuata dopo incubazione a 37°C per 15';
2. Nel siero del paziente conservato a temperatura ambiente (20-25°C) si formava un crioprecipitato nel giro di pochi minuti;
3. La ricerca delle crioglobuline ha dato esito positivo per crioglobulinemia di tipo I (secondo Brouet) con crioprecipitato costituito da una componente monoclonale IgM di tipo lambda, e criocrito pari a 70%.

Ulteriori indagini cliniche, strumentali e di laboratorio hanno consentito di porre la diagnosi definitiva di morbo di Waldenström nel quale la componente monoclonale si comporta da crioglobulina.

In conclusione questo caso dimostra come una crioglobulinemia caratterizzata dalla formazione del precipitato a temperatura ambiente possa trarre in inganno sia il clinico che il laboratorista.

¹ Bain BJ. Errors in platelet counts. *Blood cells a practical guide* (2nd edition). Blackwell Science - London 1995.

M067

Ippolito L., Battistelli L., Monica C.

EVALUATION OF THE MEASUREMENT OF THE SOLUBLE TRANSFERRIN RECEPTOR IN CLINIC AND SPORT

1° Laboratorio Analisi Ematochimiche - Azienda Ospedaliera di Parma, Via A. Gramsci, 14 - 43100 Parma

Soluble transferrin receptor is a protein produced in a special way from any erythroid cell precursors and then circulating in plasma where its action is to link iron, trace mineral indispensable to hemoglobin synthesis and then to the production of new red blood cells; sTfR becomes an important marker with high sensitivity to the evaluation of active iron form. Body iron compartments are: functional compartment (80% about) where iron is contained in hemoglobin and myoglobin for the transport and storage of oxygen; storage compartment (20% above) consists of the iron sequestered in ferritin and hemosiderin; these two compartments are linked by a small transport compartment (0,1% above) represented from transferrin.

About the present knowledge, sTfR is a useful marker to choose the difference of iron deficiency anemia (IDA) from the anemia of chronic disease (ACD); moreover, sTfR is correlated to the hematopoietic activity and its evaluation can be used in the monitoring of therapy with erythropoietin (EPO), as the marker to have the quick answer from its therapy, the same for the evaluation about the eventual abuse in the athletes. In the last situation, the laboratory research indirect parameters, between those, today the most useful in antidoping field is the hematocrit, that in physiological condition is almost 44%.

This parameter could be modified from some preanalytic factors, like this becomes very important to find out other parameters free from biological, preanalytical and analytical interferences.

To be able to use the sTfR like antidoping marker it is right because the EPO exogen goes up the sTfR level like EPO synthesized by the human body.

The first results of the study that we are producing include anemic patients and arrange with the data of scientific literature for the IDA and the ACD;

The values of sTfR are most high in half of nephropatic group after the EPO's therapy; our data make us in condition to approve the utility of this marker. The values we had obtained in the normal patients and in the group of athletes are in the normal range.

M068

Iacobello C., Bugari G. and Albertini A.

EVALUATION OF THE FULLY AUTOMATED LIAISON CALCITONIN ASSAY

3° Lab. Analisi - Azienda. Spedali Civili Brescia, Italy

Calcitonin (hCT), a small 32 aminoacid peptide produced by C thyroid cells, is the elective serum marker of medullary thyroid carcinoma. Despite this agreement about its clinical use, a lack of consensus, for hCT assays methods, can be experienced. Values found in UK-NEQAS (National External Quality Assessment Survey) cycle performed in 1999 indicate an overall between-lab imprecision around 50% with higher imprecision for values less than 50 ng/L. Commercial methods are based on competitive (RIA) or reagent excess (IRMA or immunochemiluminescent-ICMA) assay and this, partially, could explain some discrepancies. Moreover they are all manually performed kits with a considerable time consuming.

A new automated sandwich ICMA method was recently introduced by Byk-Gulden for the Liaison instrument based on Nichols reagents. In our lab we tested this method comparing against two different IRMAs from Biochem Immunosystems (CT-Bridge) and from Scantibodies respectively.

Thirty routine serum samples, assayed using the three methods, showed very poor agreement between CT-Bridge and the remaining two methods as indicated in the following Table

Method	Range, ng/mL (2nd IS 89/620)
IRMA - BRIDGE	<10 - 98
IRMA - Scantibodies	0.5 - 1459
ICMA - Liaison	0.4 - 2870

Similar results have been obtained from recovery tests using Scantibodies calibrators indicating a 6.7-22% for CT-Bridge and 90.5-116% for Liaison. Surprisingly all these methods are calibrated against the same preparation: 2nd IS 89/620.

This great disagreement has been obtained performing dilution test as well.

Other results, obtained assaying UK-NEQAS samples, confirming the above data, will be presented. These preliminary findings, as well as within and between-assay imprecision, indicate that Liaison hCT-assay is a consistent and reliable ICMA offering all advantages of a fully automated random access method.

M069

Borghi M.F., Zavaroni D.

ALTI LIVELLI DI PROINSULINA POSSONO ESSERE UN MARKER DI SVILUPPO DI DIABETE MELLITO TIPO 2 IN PAZIENTI CON RIDOTTA TOLLERANZA GLUCIDICA?

Laboratorio Ria Medicina Nucleare, Divisione Diabetologia, Ospedale Civile Piacenza

I pazienti con ridotta tolleranza glucidica (IGT) hanno un aumentato rischio di sviluppare un diabete mellito (DM) di tipo2. In questi pazienti si associa spesso obesità ed un'eccessiva secrezione β -cellulare di Insulina (I) e Proinsulina (PI). Scopo di questo studio è stato di valutare se, nei pazienti con IGT che evolve a DM tipo2, l'ipersecrezione betacellulare sia rappresentata da una relativa secrezione di PI rispetto all'I, che potrebbe essere utilizzata come marcatore per identificare precocemente i pazienti a maggior rischio evolutivo.

Abbiamo studiato tra il 1996 ed il 1999 una popolazione afferente al Reparto di Diabetologia di 55 pazienti con BMI<25 ed età compresa tra 18 e 76 anni classificati come IGT in base al test di tolleranza glucidica. Abbiamo dosato la PI e l'I al tempo 0' e a tutti i tempi previsti nel test di somministrazione di 75 gr. di glucosio.

Per il dosaggio della PI viene utilizzata una metodica di produzione LINCO RESEARCH INC. con tecnica RIA doppio anticorpo e PEG per la separazione B/F con una crossreattività del 95% per il frammento des 31-32 PI. Sensibilità 2 pmol/l ed intervallo di lavoro di 2-100 pmol/l. Per il dosaggio dell'I si è utilizzata una metodica IRMA che si avvale di 2 anticorpi monoclonali (SANOFI PASTEUR) senza crossreattività per la PI intatta e PI des 31-32.

Nel corso del 2000 23 di questi pazienti (9F/14 M) età 57.9 ± 8.8 anni hanno sviluppato DM tipo2 mentre 32 (19F/13M) età 52.9 ± 13.7 anni sono rimasti IGT. Il gruppo di pazienti IGT (N23) che è evoluto in DM tipo2 ha una PI basale di 31.7 ± 3.3 E.S. pmol/l mentre la popolazione che è rimasta IGT (N32) ha PI di 20.5 ± 2.7 E.S. pmol/l $p=0.01$. Anche a tutti i tempi previsti nel test da stimolo i valori di PI nella popolazione che ha sviluppato DM tipo2 erano statisticamente significativi rispetto alla PI del gruppo di pazienti che rimasero IGT. I valori dell'I nelle due popolazioni esaminate non erano significativamente differenti.

Nel campione esaminato in questo studio retrospettivo, i livelli di PI sia basali che dopo stimolo sono più elevati negli IGT che sono evoluti nel tempo a DM tipo2, con una differenza statisticamente significativa. Invece il dosaggio dell'Insulina non è riuscito a discriminare con differenza significativa le due popolazioni.

Il nostro obiettivo futuro sarà quello di identificare, nella popolazione di IGT evoluti a DM tipo2, un valore soglia della PI che possa discriminare gli IGT a maggior rischio evolutivo, permettendo un intervento terapeutico mirato e più aggressivo.

M070

°Bugari G.,*Gambera A., °Iacobello C., *Falsetti L., °Albertini A.

SERUM LEPTIN LEVELS AND IGF-I/IGFBP SYSTEM IN WOMEN WITH HYPOTALAMIC AMENORRHEA.

°3 Laboratory Analysis, Spedali Civili-Brescia, Italy

*Department of Gynaecological Endocrinology, University of Brescia, Italy

The development of hypothalamic amenorrhea (HA) is often associated with weight loss; the Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) system and leptin play an important role in the regulation of body composition.

The regulation of these two hormonal systems by insulin has been investigated but the interactions, between leptin and IGF-I axis remain unclear.

In this study we analyzed in a group of normal weight women with HA the IGF-I axis and leptin.

BMI (Body Mass Index), Leptin, Insulin, Cortisol total IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP3 were measured after an overnight fast in 15 patients with hypothalamic amenorrhea and 15 normal women.

Serum insulin and cortisol levels were measured using a chemiluminescent method (Immulate One and Immulate 2000 Medical Systems SpA); Leptin (DRG Diagnostics GmbH, Germany), IGF-I and IGFBP-3 (Nichols Institute Diagnostics CA U.S.A.), IGFBP-1 (DSL, Inc Webster, TX), were quantified by RIA methods.

The results are showed in Table1.

TABLE 1: Hormone levels of 15 women with HA and 15 controls.

Control n = 15		HA n = 15
BMI (Kg/m ²)	20.9 ± 1.5	20.1 ± 2.2
Leptin (ng/mL)	11.1 ± 3.4	7.4 ± 4.4*
Insulin (uUI/mL)	5.1 ± 1.1	7.6 ± 3.9*
Cortisol (ug/dL)	11.2 ± 2.4	15.9 ± 4.3**
IGF-I (ng/mL)	191 ± 30.3	197 ± 52.3
IGFBP-3 (ug/mL)	2.8 ± 0.4	3.6 ± 0.7**
IGFBP-1 (ng/mL)	28.7 ± 16.5	41.3 ± 14.4*

* p< 0.05

** p< 0.005

Although serum levels of IGF-I were not reduced in HA, our results showed elevated serum levels of IGFBP-1, a potent inhibitor of the insulin-like activity of IGF-I.

In addition in HA we found leptin serum levels significantly lower than controls in absence weight loss but higher serum levels of insulin and cortisol ($p<0.005$). The association of these alterations confirm that unknown factors could influence the interaction of energy status and leptin regulation in chronic conditions.

Metabolism Vol. 48 N.7 1999

M071

Martinasso G.¹, Migliardi M.², Avezzano S.¹, Ferrero E.¹, Gabriele A.¹, Miotto E.², Lanza E.³, Polloni R.⁴, Aimo G.¹, Pagni R.¹.

EVALUATION OF THE ANALYTICAL PERFORMANCES OF TSH ASSAY ON THE ABBOTT ARCHITECT ANALYSER

¹Laboratorio Centrale Baldi e Riberi, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino

²Laboratorio di Ormonologia, Divisione di Endocrinologia Ospedale Mauriziano "Umberto I" di Torino

³Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale di Biella

⁴Laboratorio di Medicina Nucleare Ospedaliera, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino

This study was conducted to evaluate the analytical performance of the thyroid stimulating hormone (TSH) assay on Architect i2000 analyser (Abbott, Abbott Park II, USA) and to compare results with AutoDelfia Ultra (Wallac), Elecsys 2010 Rack (Roche), Immulite 2000 (DPC), IRMA Byk Gulden, IRMA CIS, IRMA Behring. Within and inter-assay precisions, tested on 8 serum pools and on Bio-Rad Lyphochek Immunoassay plus controls (range 0.0050-30.0 mU/l) with two lots of reagents in single replicates, were less than 4.5% except for the pool with mean concentration = 0.0050 mU/l (CV=6%), and less than 10%, respectively. The analytical sensitivity, calculated from twenty measurements of the zero calibrator was 0.0011 mU/l. The functional sensitivity, i.e. the lowest concentration corresponding to 20% inter-assay CV, determined on serum pool in 20 different runs during a 10-week period with two lots of reagents in single replicates, was 0.0020 mU/l.

Comparison between Architect result and the other tested methods yielded Pearson's coefficients of 0.99 except for Byk method (0.953) with an underestimation of Architect assay (overall mean bias 1.07) as assessed by Altman and Bland analysis. Passing and Bablok slope values ranged between 0,671 (Cis) to 0,998 (AutoDelfia Ultra).

Architect TSH assay showed high analytical reliability with results comparable with those of widely used methods. Its diagnostic accuracy, however, should be further evaluated in a clinical setting, where the high sensitivity, peculiar to fourth generation assay, is expected to provide excellent results.

M072

Baldi C., Mengozzi G., Bianconi S., Ciocia E., Priolo G., Bianchi G., Mullineris B., Gasparri G., Aimo G.

INTRAOPERATIVE PTH MONITORING: A PRELIMINARY REPORT

Laboratorio di Chimica Clinica Baldi e Riberi, e °Terza Divisione Universitaria Chirurgia Generale, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista di Torino

With the aim to verify the most practical approach to PTH monitoring during parathyroid surgery, we present our initial experiences with a rapid immunochemiluminometric (ICMA) assay (QuiCk-Intraoperative™ Intact PTH by Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA) performed on a portable cart directly in the operating room. PTH levels measured by the quick assay on plasma and on serum samples were comparable, with a slight overestimation of serum PTH concentrations ($r^2 = 0.96$; intercept = 17.95 and slope = 1.05, $n=30$). ICMA results correlated well with those of the modified IRMA Nichols (turn-around-time of about 45 minutes; $r^2 = 0.96$; $i = 22.80$ and $s = 1.57$, $n=14$). Furthermore, a good correlation was found between quick plasma PTH values and either plasma or serum PTH levels determined by overnight IRMA Nichols ($r^2 = 0.87$; $i = -15.17$ and $s = 1.11$, $n=62$, and $r^2 = 0.84$; $i = 4.92$ and $s = 0.97$, $n=56$, respectively) as well as N-tact DiaSorin ($r^2 = 0.90$; $i = -1.90$ and $s = 0.69$, $n=70$, and $r^2 = 0.93$; $i = -12.58$ and $s = 0.70$, $n=61$, respectively). Studied population included 12 patients with primary hyperparathyroidism (HPT), 16 end-stage renal disease patients with secondary HPT, and 5 kidney transplanted subjects with tertiary HPT. Peripheral blood samples were taken at the induction of anesthesia, within 10-15 minutes after resection and thereafter at times whenever judged by the surgeon. PTH results were available in a total elapsed time of 12 minutes. The mean PTH levels before and after parathyroidectomy were 230.5 pg/mL (range 69-842) and 47.3 (5-184), respectively, in primary HPT, 855.0 (416-1655) and 202.2 (53-440) in secondary HPT, 205.6 (116-301) and 45.4 (18-97) in tertiary hyperplasias. All patients had significant percentage decline from pre-excision values (mean 77.9%, 79.0%, and 68.0% in primary, secondary and tertiary cases, respectively) except one patient with recurrent secondary HPT. While a reduction > 50% was detected in 30 out of 33 patients after the first intraoperative sampling, additional dosages were requested by the surgeon in 10 cases. On-site PTH monitoring with this user-friendly and reliable system has revealed quite helpful in targeting PTH tests to give surgeons a timely and accurate assessment of intervention.

M073

Migliardi M., Germano L., Di Grazia M., Gallone G., Martinasso G.*, Mengozzi G.*, Aimo G.*, Fonzo D.

MEASUREMENT OF SUBNORMAL TSH LEVELS USING THE ABBOTT ARCHITECT ANALYSER: ANALYTICAL AND CLINICAL EVALUATION

Laboratorio di Ormonologia, Divisione di Endocrinologia, Ospedale Mauriziano "Umberto I" di Torino
*Laboratorio Centrale Baldi e Riberi, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino

Recent increases in the sensitivity of methods employed to measure TSH have enabled to discriminate between partial and complete pituitary suppression. However, at present, these valuable results, obtained with third generation assays, call for further analytical and clinical goals: (1) better between methods standardisation of TSH measurement at low concentrations (< 0.2 mIU/l), (2) complete removal of interference due to heterophilic antibodies and similar factors, (3) higher ability to quantify different levels within TSH suppression. The aim of this study has been to evaluate the analytical and clinical performances of a new fourth generation TSH assay on the Architect i2000 analyser (Abbott) (A) in comparison with a third generation assay, the AutoDelfia Ultra (Wallac) (U). The A and U TSH assays utilise respectively an ICMA method (functional sensitivity = 0.002 mIU/l) and a TR-IFMA method (functional sensitivity = 0.012 mIU/l). Serum samples from 83 subjects with U TSH values ranging from undetectable levels (< 0.003 mIU/l) to 0.3 mIU/l were selected to evaluate the correlation between the two methods. Within these 83 subjects four pathological conditions were identified: (a) overt hyperthyroidism ($n=7$) (b) treated hyperthyroidism ($n=12$), (c) subclinical hyperthyroidism ($n=10$), (d) therapy with thyroxine ($n=17$). The regression analysis indicates a good correlation of A vs. U ($y = 0.9158x - 0.0082$, $r = 0.9552$). However in 10 subjects we found a significantly lower TSH value with A method (A: $< 0.0005 \div 0.065$ / U: $0.013 \div 0.162$, mIU/l). Five of these cases showed an increased FT4 and/or FT3 value; we are in the presence of incongruously high U TSH results, possibly due to matrix effects and/or interference from heterophilic antibodies. After exclusion of these 10 samples correlation coefficient improved to 0.9843 . FT4 median values (pg/ml) obtained in the four patient groups were: (a) 49.8 (b) 17.0 (c) 10.5 (d) 11.7 ; U TSH and A TSH ranges (mIU/l) were respectively: (a) $< 0.003-0.041$ / $< 0.0005-0.0018$ (b) $< 0.003-0.27$ / $0.0005-0.26$ (c) $0.009-0.27$ / $0.0042-0.30$ (d) $0.005-0.27$ / $0.0036-0.24$. As expected the A TSH assay is able to better quantify the different degrees of TSH suppression and therefore to better differentiate the untreated hyperthyroid patients from the other groups, particularly from patients under treatment with thyrostatic. Moreover the A TSH assay appears to be optimally protected against non specific interference.

M074

Marchese N., Minicucci L., Mangraviti S., Cresta L., Barbagallo L., Deiana F., Canini S.

STUDIO DELL'ASSE IPOFISI-SURRENE IN SOGGETTI TRATTATI CON CORTISONICI INALANTI NELLA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA DELLA FIBROSI CISTICA: DOSAGGI EMATOCHIMICI, CORTISOLO SALIVARE E PROFILO GASCROMATOGRAFICO DEGLI STEROIDI URINARI

Laboratorio Centrale di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia ISTITUTO G. GASLINI Largo G.Gaslini, 5 -16147 GENOVA

Nella Fibrosi Cistica (FC) la broncopneumopatia rappresenta il principale fattore condizionante la prognosi della malattia: la broncoostruzione cronica, è caratteristica peculiare della broncopneumopatia e i cortisonici inalanti possono giocare un ruolo terapeutico importante. Il Centro di Fibrosi Cistica dell'Università di Genova ha formulato uno studio per confrontare l'efficacia, la comparsa di effetti collaterali a carico dell'asse ipofisi-surrene e l'accettabilità per la terapia con beclometasone propionato (BDP) per via aerosolica e un altro cortisonico inalante, di più recente introduzione, e somministrato con modalità differente come il budesonide per turbohaler (BUD). Sono entrati nello studio 15 pazienti (9 maschi; età media 21 anni, range età 7- 40 anni) con diagnosi accertata di FC. I pazienti sono stati divisi in due gruppi A (8 soggetti) e B (7 soggetti): i pazienti del gruppo A hanno effettuato per otto settimane trattamento con BUD, mentre i pazienti del gruppo B nello stesso periodo hanno eseguito trattamento con BDP. Nelle otto settimane successive i due gruppi hanno invertito il trattamento. Ad ogni controllo sono stati valutati i dati clinici e sono stati effettuati i dosaggi ematici di cortisolo e ACTH, cortisolo salivare e gascromatografia degli steroidi urinari. I dosaggi plasmatici di ACTH e cortisolo sono stati eseguiti con metodo immunometrico in chemiluminescenza, per il cortisolo salivare è stata utilizzata una metodica RIA. Abbiamo inoltre eseguito la gascromatografia degli steroidi urinari identificando i seguenti metaboliti: pregnandiolo, androsterone, eticolanolone, deidroepi androsterone, pregnantriolo, ketoandrosterone, ketoeticolanolone, OHprogesterone, pregnentriolo, desossitetraidrocortisolo, tetraidrocortisone, tetraidro cortisolo, allotetraidrocortisolo, alfacortolo e betacortolo. I campioni urinari, dopo idrolisi enzimatica, estrazione e derivatizzazione venivano analizzati mediante GC capillare. Data la numerosità del campione, mediante il test non parametrico di Friedman, abbiamo osservato che non c'era differenza statisticamente significativa tra i due trattamenti cortisonici, per cui l'utilizzo del BUD poteva essere impiegato facilmente per semplificare il gravoso programma terapeutico quotidiano di questi pazienti senza introdurre alcun effetto collaterale di soppressione ormonale.

M075

C. Baldi¹, G. Martinasso¹, E. Cocciardi², L. Germano², A. Gabriele¹, M. Marino⁴, P. Milani⁵, P. Puccinelli³, M. Migliardi², G. Aimo¹

EVALUATION OF THE ANALYTICAL PERFORMANCES OF FT3 AND FT4 ASSAYS ON THE ABBOTT ARCHITECT ANALYSER.

¹Laboratorio Centrale Baldi e Riberi Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino

²Laboratorio di Ormonologia, Divisione di Endocrinologia, Ospedale Mauriziano "Umberto I" di Torino

³Laboratorio Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino

⁴Servizio di Patologia Clinica, Azienda Osp. CTO, CRF, Maria Adelaide, Torino

⁵Laboratorio Analisi Ospedale di Ivrea

The aim of this study was to evaluate the technical performance for free thyroxine (FT4) and free triiodothyronine (FT3) assays on Architect i2000 analyser (Abbott, Abbott Park, IL, USA). Within-run and between-day variations were tested on 4 serum pools and on Bio-Rad Lyphochek Immunoassay plus controls in twenty replicates for each analyte. Architect results were compared with two automatic FT3 and FT4 methods (AutoDelfia Wallac, Elecsys 2010 Roche), a traditional RIA method (Amerlex-Mab, Ortho), as well as a RIA with chromatographic separation (Liso-Phase, Technogenetics).

The detection limit, calculated from twenty measurements of the zero calibrator was 0.39 pg/ml for FT3 and 0.12 pg/ml for FT4. Within-run and between-day imprecision were less than 5.0% and 9.0% for FT4 (range 5.5-27.0 pg/ml) and less than 8.0% and 10% for FT3 (range 1.6-10.6 pg/ml), respectively.

Regression analysis according to Passing and Bablok, Pearson's coefficient and Altman and Bland comparison yielded the following equations for FT3: ARC = 0.85 DELFIA - 0.37, n=132, r=0.964, bias=1.126; ARC= 0.644 Elecsys + 0.24, n=78, r=0.903, bias=1.37; ARC = 0.95 Amerlex-Mab - 0.485, n=62, r=0.929, bias=1.032; ARC = 0.624 Liso-phase + 0.339, n=154, r=0.930, bias=1.18. Similarly, for FT4: ARC = 1.23 Delfia - 0.539, n=169, r=0.937, bias=-1.631; ARC=0.824 Elecsys - 0.476, n=77, r=0.957, bias=2.357; ARC = 0.783 Amberlex-Mab + 1.265, n=66, r=0.974, bias=1.373; ARC= 0.968 Liso-phase + 2.495, n=182, r=0.930, bias=1.75.

The FT3 and FT4 assays on Architect analyser showed good correlation coefficients with respect to other routinely adopted methods, although a general underestimation of FT3 results has been observed.

M076

Zaccaria T., Mengozzi G., Martinasso G., Biasiol S., Salvo R., Marranca R.*, Migliardi M.*, Giuglini B.*, Fonzo D.*, Aimo G.

BETWEEN-METHOD VARIABILITY IN THE MEASUREMENT OF PARATHYROID HORMONE LEVELS

Laboratorio di Chimica Clinica Baldi e Riberi, ASO San Giovanni Battista di Torino

*Laboratorio di Ormonologia, Divisione di Endocrinologia, Ospedale Mauriziano Umberto I, Torino.

The determination of parathyroid hormone (PTH) levels has become increasingly important over recent years. Yet, both the lack of an international standard and the immunoheterogeneity of circulating PTH as well as the adoption by many laboratories of non-radioisotopic methods render comparisons of PTH results from different centers very difficult. The aim of this study was to evaluate PTH testing performances of four methods among those most widely used (IRMA N-tact DiaSorin, IRMA Allegro Nichols, immunochemiluminometric automated Advantage Nichols, and Immulite 2000 DPC) on representative samples from our routine, including sera of patients with chronic renal failure, primary hyperparathyroidisms, and hypoparathyroidism. For correlation studies, the linear regression and Passing and Bablok analyses were applied followed by Altman and Bland comparison tests. Overall, while a good agreement was observed IRMA Allegro and Advantage assays (slope 0.94, intercept -1.18, r=0.99, mean bias 0.19; n=96), IRMA DiaSorin yielded relatively lower results with respect to all other tested methods (vs. Advantage: slope 0.85, intercept 4.88, r=0.97, mean bias 13.6; n=97 and vs. IRMA Allegro: slope 0.82, intercept 1.51, r=0.97, mean bias 21.8; n=284 as well as vs. Immulite 2000: slope 0.84, intercept 2.85, r=0.95, mean bias 52.0; n=139). On the other hand, Immulite 2000 gave higher results (vs. Advantage: slope 1.40, intercept 0.19, r=0.99, mean bias -50.5; n=96 and vs. IRMA Allegro: slope 1.32, intercept -1.32, r=0.98, mean bias -41.4; n=128). Data obtained with considered methods resulted highly dispersed and this scattered distribution could be accounted for by differences in the ability of analytical antibodies to recognize diverse molecular forms of circulating PTH, including large amino-terminally truncated fragments. Our findings indicate that PTH results detected by different assays should be cautiously interpreted as far as their clinical implication is concerned.