

## M117

Melotti D., Alba P., Guidi L., \*Daguati R., \*Dal Pino D., Corbetta C.

### LIVELLI PLASMATICI DI OMOCISTEINA DOPO LA MENOPAUSA

Laboratorio Ricerche Cliniche. A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano.

La Clinica Ostetrico Ginecologica. Università degli Studi di Milano.

La malattia cardiovascolare è la principale causa di morte per la donna oltre i 50 anni nei paesi industrializzati. L'incremento del rischio relativo, oltre che all'età, è stato relazionato da diversi autori agli effetti della menopausa ed alla conseguente carenza di estrogeni. Attualmente è diventato oggetto di interesse l'omocisteina (HCY), aminoacido solforato intermedio del metabolismo della metionina, considerato un indipendente fattore di rischio cardiovascolare.

Scopo dello studio è valutare l'influenza della menopausa sui livelli plasmatici di HCY attraverso il confronto di due campioni di donne in pre e post menopausa, osservando le concentrazioni plasmatiche di HCY dopo la menopausa e in rapporto all'età. Presso l'ambulatorio di ginecologia della terza età sono state reclutate 335 donne in menopausa da almeno un anno (FSH >40 mUI/l; età media =  $55.6 \pm 5.2$  anni), escludendo le pazienti affette da insufficienza epatica o renale, patologia gastrointestinale, ipertensione arteriosa e patologia tromboembolica in atto. I risultati sono espressi come media  $\pm$  DS ed analizzati statisticamente con il test di Student. Il livello medio di HCY, determinato in HPLC (Kit Bio-Rad), era di  $8.2 \pm 3.4 \mu\text{Mol/l}$  e correlava positivamente con l'età ( $p < 0.01$ ) e con gli anni di menopausa ( $p < 0.003$ ). Inoltre la distribuzione dei livelli di HCY in rapporto all'età delle pazienti evidenziava una differenza significativa ( $p < 0.02$ ) tra le donne di età  $\leq 55$  anni e quelle di età  $\geq 56$  anni.

Confrontando i risultati ottenuti con quelli di un gruppo di 41 donne in premenopausa, si osserva una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) tra i livelli plasmatici di HCY: le donne in pre-menopausa hanno valori di HCY più bassi ( $7.5 \pm 2.8 \mu\text{Mol/l}$ ) ed inoltre risultano più giovani ( $48.5 \pm 3.9$  anni) di quelle in menopausa.

Valutando la concentrazione media di HCY in rapporto alla durata della menopausa, si osserva che, mentre esiste una differenza significativa ( $p < 0.02$ ) tra le pazienti in postmenopausa e quelle in premenopausa, non si evidenzia differenza tra quest'ultime ed il gruppo di donne in menopausa da < 5 anni ( $n=129$ ; HCY =  $7.8 \pm 3.1 \mu\text{Mol/l}$ ); le pazienti in età menopausale avanzata ( $n=182$ ) presentano inoltre livelli plasmatici di HCY significativamente più elevati ( $8.5 \pm 3.6 \mu\text{Mol/l}$ ) di quelle in menopausa da < 5 anni.

I risultati ottenuti consigliano l'ampliamento dello studio, evidenziando nelle donne in menopausa eventuali correlazioni tra i livelli di HCY e deficit enzimatici e/o vitaminici e valutando gli effetti della terapia ormonale sostitutiva a base di estrogeni.

## M118

Melotti D., Guidi L., Alba P., \*Edefonti A., \*Loi S., \*Merlotti C., Corbetta C.

### OMOCISTEINEMIA IN PAZIENTI DI ETÀ GIOVANILE SOTTOPOSTI A DIALISI O TRAPIANTO DI RENE.

Laboratorio Ricerche Cliniche e \*Servizio Dialisi. A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano.

Gli effetti delle patologie renali sul metabolismo dell'Omocisteina (HCY) sono ampiamente noti: la diminuzione della "clearance", associata ad altri fattori, contribuisce all'incremento dei valori plasmatici di questo aminoacido, aumentando notevolmente il rischio di complicanze cardiovascolari.

In questo studio si sono valutati i livelli plasmatici di HCY in pazienti di età giovanile ( $18.9 \pm 7.7$  anni), sottoposti a emodialisi (ED), dialisi peritoneale (DP) o trapianto di rene (TRP) evidenziandone eventuali correlazioni con deficit vitaminici, creatinina e quadro lipemico.

	n	HCY*	HHCY	FOLATI	Vit.B12
		( $\mu\text{Mol/l}$ )	(%)	(ng/ml)	(pg/ml)
DP	13	7.72	15.4	27.10	913
ED	19	27.37	94.7	7.18	425
TRP	69	14.89	66.6	3.47	615
CTR	111	8.46	—	—	—
V.Rif.	—	<11.96	>95%ileCTR	3.3-27.0	211-911

I risultati riportati evidenziano come, rispetto al gruppo controllo, la concentrazione mediana (\*) di HCY, determinata in HPLC (Kit Bio-Rad), appaia significativamente diversa nel gruppo ED ed in quello TRP ( $p < 0.00001$  in entrambi i casi). Nei pazienti in DP la concentrazione media dei folati serici risulta ottimale (il 66.6% veniva supplementato) e di conseguenza solo in due casi si evidenzia iperomocisteinemia (HHCY). I pazienti in ED presentano una concentrazione di folati mediamente inferiore (solo il 21% era supplementato), con un'incidenza di HHCY decisamente più elevata: la correlazione inversa appare significativa ( $r = -0.48$ ;  $p < 0.05$ ). Il valore di folatemia risulta decisamente insufficiente nei pazienti sottoposti a trapianto, che presentano nel 66.6% dei casi HHCY: anche in questo caso la correlazione tra HCY e folati è significativa ( $r = -0.40$ ;  $p < 0.001$ ). La correlazione tra HCY e creatinina risulta positiva nel gruppo ED ( $r = 0.52$ ;  $p < 0.05$ ) ed in quello TRP ( $r = 0.354$ ;  $p < 0.005$ ), mentre non appare significativa nei pazienti in DP. Ugualmente, infine, in tutti e tre i gruppi non si è riscontrata relazione tra HCY, colesterolo, trigliceridi e Vit.B12 (risultando quest'ultima, in particolare, in ambito di normalità per tutti i casi studiati).

I risultati ottenuti evidenziano come nei pazienti con alterata funzionalità renale o sottoposti a trapianto i livelli di HCY siano decisamente aumentati e come la loro valutazione risulti utile per prevenire complicazioni di carattere aterotrombotico (principale fattore di morbilità e mortalità in tali soggetti): appare pertanto importante il monitoraggio della folatemia e l'eventuale supplementazione farmacologica nei pazienti con deficit vitaminico.

## M119

<sup>1</sup>Bartesaghi S., <sup>2</sup>Accinni R., <sup>1</sup>Galluzzo C., <sup>1</sup>De Leo G., <sup>2</sup>Cursano C., <sup>2</sup>Campolo J., <sup>2</sup>Dellanoce C., <sup>2</sup>Naggi P., <sup>1</sup>Vegezzi G., <sup>2</sup>Parodi O.

### MICROMETODO IN HPLC PER IL DOSAGGIO DELL'OMOCISTEINA TOTALE PLASMATICA NEL NEONATO

<sup>1</sup>Ospedale "Sacra Famiglia" FBF-AFaR, Erba (CO); <sup>2</sup>Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Milano

La determinazione di omocisteina totale plasmatica (tHcy) è essenziale per la diagnosi e il follow-up di pazienti con iperomocisteinemia, fattore di rischio per patologie vascolari. Nell'infanzia una moderata iperomocisteinemia può essere causata da diversi fattori sia genetici che acquisiti. Pochi sono gli studi che hanno determinato i valori normali di tHcy nell'infanzia e soprattutto in epoca neonatale. Obiettivo di questo studio è stata la messa a punto di un metodo isocratico in HPLC in grado di processare minimi volumi plasmatici per il dosaggio di tHcy nel neonato. Un campione di sangue proveniente dal tallone viene raccolto usando un capillare di vetro eparinato. Un volume di plasma variabile da 1 a 10 µL viene portato a 100 µL con soluzione fisiologica e derivatizzato con ammonio-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato dopo riduzione con tri-*n*-butilfosfina e analizzato su una colonna Discovery C18 Supelco, eluita con tampone fosfato 0.1 M contenente 8% di acetonitrile, pH=2.1. Questa analisi presenta un buon recupero (95%) e precisione (CV=4.5%). La linearità è stata calcolata addizionando concentrazioni crescenti di omocisteina (Hcy) (da 0.5 a 30 µM) in 0.14 M di soluzione fisiologica ( $y=2.41x+0.31$ ;  $r=1$ ). La procedura utilizzata rappresenta una variante di un metodo HPLC già in uso per una popolazione adulta (1). In una popolazione di 1400 neonati, risultati sani al controllo clinico, sono stati dosati i livelli di tHcy ottenendo una media di  $5\pm 2,3$  µM. Grazie alla sua semplicità e affidabilità, questa analisi può essere usata per la determinazione routinaria di tHcy e degli altri aminotioili (cisteina, cisteinilglicina e glutatione). Inoltre questo metodo richiede solamente un prelievo capillare di sangue eseguito senza alcun trauma per il neonato, rendendo così possibile una precoce diagnosi e follow-up di soggetti iperomocisteinemici.

### BIBLIOGRAFIA

[1] R. Accinni, J. Campolo, S. Bartesaghi, G. De Leo, C. Lucarelli, C.F. Cursano, O. Parodi, J. Chromatogr. A 828 (1998) 397.

## M120

Paroni R., Arcelloni C., Comuzzi B., Brocco S.#, de Kreutzenberg S.#, Tiengo A.#, Genovese S.\*, Ciucci A.\*, Beck Peccoz P. §

### CAPILLARY ELECTROPHORESIS AS ADDITIONAL METHOD FOR FACTITIOUS HYPOGLYCAEMIA DIAGNOSIS

Lab. Separative Techniques, IRCCS H San Raffaele #Unit of Metabolic Disease, Azienda Ospedaliera e Università', Padova, Italy, \*Endocrinology and Diabetes Unit, Clinical Institute Humanitas, Milano, Italy and §Institute of Endocrinological Science, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano, Italy

Diagnosis of "factitious hypoglycaemia" is essentially based on the disclosure of hypoglycaemic agents in blood or urine. Aim of this study was to check the performance of capillary electrophoresis as a quantitative method for determination of chlorpropamide, tolbutamide, glipizide, gliclazide, glibenclamide in serum (1).

CE separation was carried out by micellar electrokinetic capillary chromatography using a P/ACE 5010 system (Beckman Instruments) equipped with a monochromatic U.V. detector and controlled by the System Gold 8.1 software. The fused silica capillary 50 µm i.d., 27 cm in length (20 cm to the detector) was assembled in a Beckman cartridge (200X400 µm slit aperture). The CE running buffer was made with 5 mmol/L borate, 5 mmol/L phosphate, 75 mmol/L sodium cholate and 2.5% methanol. The washing buffer was 10-times more concentrated. For a typical analysis the following procedure was used: 3 min pre-rinse with the running buffer (20 psi, 138 KPa), 2-5 s injection of the sample at low pressure (0.5 psi, 3.4 KPa), 1 s pressure injection of running buffer, separation at 10 kV (37 µA), 1 min rinse with the washing buffer followed by 1 min with 0.1 mol/L NaOH. The capillary temperature was 25 °C. Serum samples (1 mL) were added with the internal standard, purified by solid phase extraction on OASIS™ HLB extraction cartridges (3 mL, 60 mg) (Waters Milford, MA), dried and reconstituted with 30-60 µL of a mixture acetonitrile:water (60:40, v:v).

Pharmacokinetics of gliclazide (80 mg tablet) in a diabetic patient was assessed both by HPLC and capillary electrophoresis. Two hypoglycaemic patients positive by HPLC analysis to unreported gliclazide and tolbutamide overdose, were screened also by capillary electrophoresis. Linearity ( $r^2\geq 0.998$ ) and recovery ( $\geq 80\%$ ) were good for all the sulfonylurea drugs tested. The pharmacokinetic curve of gliclazide obtained by CE was perfectly superimposable to the one by HPLC. CE analysis confirmed the HPLC diagnosis of surreptitious abuse of tolbutamide and gliclazide in two suspected patients and proved to be a useful tool in the clinical chemistry and toxicological laboratory, also for a quantitative application. 1) Roche ME, Oda RP, Lawson GM, Landers JP. Electrophoresis 1997; 18: 1865-74.

## M121

Paroni R., \*Ferrero C., \*Carobene A., \*Guerra E., Arcelloni C.

### CREATININE DETERMINATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS: AN ALTERNATIVE TO THE REFERENCE METHOD BY HPLC

Separative Techniques and \*Standardization Laboratories, IRCCS H San Raffaele via Olgettina 60 20132 Milano, Italy.

Aim of this study was to set up a method by capillary electrophoresis (CE) for reliable determination of creatinine (CREA) in human serum (1).

CE separation was carried out using a P/ACE 5010 System (Beckman Instruments) equipped with a monochromatic UV detector at 200 nm and controlled by the System Gold 8.1 software. The fused silica capillary 50  $\mu\text{m}$  i.d., 27 cm in length (20 cm to the detector) was assembled in a Beckman cartridge (200X400  $\mu\text{m}$  slit aperture). For a typical analysis the following procedure was used: 1.5 min pre-rinse with the running buffer  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.15 M, pH 2.5, 10 s injection of the sample at 0.5 psi, 1 s pressure injection of running buffer, separation at 10 kV (65  $\mu\text{A}$ ), rinse 0.5 min with  $\text{HCl}$  0.1 M, 0.5 min with  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 min with  $\text{NaOH}$  0.1 M, 0.5 min with  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M, 0.5 min with the running buffer. The capillary temperature was maintained at 25 °C. Serum aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) were diluted with water, accordingly to their initial concentration, to about 1 mg/dL and 100  $\mu\text{L}$  added to 100  $\mu\text{L}$  of 1-methylimidazole (1 mg/dL) used as internal standard (IS), diluted to 0.8 mL with 0.01% TFA and directly analysed by CE.

Under the described conditions the migration times were  $2.93 \pm 0.02$  and  $3.55 \pm 0.03$  min for the IS and for CREA, respectively (n=32). The linear regression analysis performed on an aqueous standard curve by plotting the area ratio CREA/IS vs the mg/dL of CREA in the 0.5-10 mg/dL range, gave the equation  $Y = 1.056 - 0.014X$ ,  $r = 0.9999$ . The between-day CV on 6 independent measurements performed on 3 different days on lyophilised materials was 1.7% (0.9-2.6). The within-run CV% was 0.9%. The inaccuracy was +0.30 (CV%=2.2, n=9) and +0.38% (CV%=2.2, n=12) as determined with the NIST standard reference materials 909a1 and 909a2. Specificity was confirmed by analysing two patients' sera that gave different results with Hitachi 747 and Vitros 950 analyzers. The CE results were in good agreement with an established HPLC method. Comparison with HPLC will be done on 22 lyophilised materials and 20 frozen human serum pools. CE seems quite advantageous in respect to other established reference methods being cheaper and faster, although it deserves further studies to be fully validated as a Reference Method..

(1) Thienpont LM, Van Landuyt KG, Stockl D, Sayens W, De Keukelaire D, De Leenheer AP. J. Chromatogr. B 1995; 665: 63-69.

## M122

Arcelloni C., \*Polo S., \*Lusso P., Paroni R.

### AGGREGATION OF THE C-C CHEMOKINE RANTES AND MUTATED ANALOGUES ANALYSED BY SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY GEL ELECTROPHORESIS

Laboratory of Separative Techniques and \*Unit of Human Virology, IRCCS H S Raffaele, Via Olgettina, 60 Milan, ITALY.

RANTES is an inflammatory C-C chemokine of 7.8 kDa, which potency antagonizes HIV infection. Under physiological conditions, RANTES was shown to aggregate into multimeric complexes (on average 12x), although only the monomeric and dimeric forms seems to be biologically active (1). This tendency to aggregate represents one of the potential obstacle to the use of RANTES or its analogues as therapeutic agents.

Aim of this study was to evaluate the aggregation capacity of wild-type (WT) RANTES from different sources (recombinant, produced either in *E. coli* or in baculovirus, or synthetic), as well as to investigate the role of selected aminoacid residues in aggregation by testing a panel of mutated analogues of RANTES (C1.C5, D6R, F12A, Y14A, R17A) produced in baculovirus. The native molecular weight (MW) of the RANTES aggregates was determined by size exclusion chromatography (SEC) by a Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) column eluted with phosphate buffer (pH 7.4) and calibrated in a MW range of 2.9-97.4 kDa. SDS-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) was also used, employing the eCAP<sup>TM</sup> SDS 14-200 kit (Beckman) for the determination of the MWs in the 14.2-205 kDa range. The dimer (2x) was found to be the predominant form in all the samples tested at 0.1-1.0 mg/ml both by SEC and SDS-CGE. High-MW aggregates (MW 35 kDa, 4x) were only detected at a higher dose range (5-10 mg/ml). Dimer dissociation was observed upon denaturation with  $\beta$ -mercaptoethanol or overnight incubation in TFA and acetonitrile. By lowering the polypeptide concentration (0.1-0.001 mg/ml), the WT and Y14A showed a modest increase of the monomeric form (up to 31%) while both F12A and D6R showed a dramatic predominance of the monomer (95%). The monomer was also increased for C1.C5 analogue, albeit less markedly (from 8 to 76%). F12A and D6R showed a markedly reduced functional activity, while C1.C5 exhibited an increased anti-HIV potency, but a reduced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation induction via CCR3 or CCR5. These data demonstrate that supramolecular aggregates of RANTES are infrequent at physiological concentrations. Moreover, mutation of selected residues within the N-terminal and N-loop domains was found to favor the dissociation of the dimeric form, which seems to correlate with the impairment of the receptor-activatory function of RANTES.

1- Skelton NJ, Aspiras F, Oreg J, Shall TJ (1995) *Biochemistry* 34, 9307-9314.

## G001

Fulgenzi A.\*, Ponti W.°, Cavani S.^, Corsi M.M.\*”

### I LIVELLI DI RADICALI LIBERI PLASMATICI INDUCONO APOPTOSI NEI LINFOCITI DI BAMBINI CON TRISOMIA 21

\*Istituto di Patologia Generale, Facoltà di Medicina, °Istituto di Microbiologia e Immunologia, Facoltà di Veterinaria, Università di Milano, ^Laboratorio di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera di Genova, ”Centro di Studio sulla Patologia Cellulare-C.N.R. di Milano.

Il coinvolgimento dei radicali liberi in alcune patologie correlate alla sindrome di Down è stato verificato dopo la scoperta del gene codificante per la Cu/Zn superossido dismutasi sul cromosoma 21 nell'uomo.

Abbiamo studiato un gruppo di 20 bambini di età compresa tra 3 e 4 anni affetti da Trisomia 21 ed un gruppo di 10 bambini di età compresa tra i 3 e 4 anni apparentemente sani, come controlli. Abbiamo utilizzato per lo studio dei radicali liberi un kit che valutava la presenza dei ROMs nel plasma (Diacron, Grosseto, Italia), espressi con una unità convenzionale come Ucar. Abbiamo separato le cellule CD3+ da sangue periferico e dopo marcatura con mAb, abbiamo valutato tramite citofluorimetria a flusso l'espressione di CD95 (APO-1/Fas) e di Annexin-V. I nostri risultati mostrano un considerevole aumento di ROMs nel plasma di bambini con Trisomia 21 rispetto ai controlli. Inoltre i linfociti dei bambini Down presentano da un lato un aumento netto nell'espressione di CD95, dall'altro una tendenza ad aumentare l'espressione di Annexin-V rispetto ai controlli. L'espressione di CD95 rappresenta l'iniziazione del processo di morte per apoptosi attraverso una cascata di reazioni a partire dalla membrana cellulare (“sistema delle caspasi”), mentre l'espressione di Annexin-V, attraverso il suo legame con la fosfatidilserina, determina le fasi iniziali del processo apoptotico (“early apoptosis”). Il processo di apoptosi rappresenta un comune meccanismo di controllo della crescita e differenziazione delle cellule del sistema ematopoietico ed immunitario ed inoltre media diversi importanti processi fisiologici. Nel nostro caso non siamo in grado di determinare se si tratti di un processo fisiologico o patologico, tuttavia possiamo correlare l'aumento di ROMs nel plasma con l'espressione di indici di apoptosi nei linfociti di sangue periferico.

#### Referenze:

Antonucci A. *et al.*, *Ultrastructural Pathology*, **21**:449-452, 1997.

Bertotto A. *et al.*, *Pathobiology*, **67**:108-110, 1999.

Yasui K. *et al.*, *Am J Med Genet*, **84**: 406-412, 1999.

## G002

Ius A., Bacigalupo M.A., Meroni G.

### A HOMOGENEOUS TIME-RESOLVED FLUOROIMMUNOASSAY FOR THEOPHYLLINE BY LYSIS OF TERBIUM TRAPPING LIPOSOMES

Istituto di Biocatalisi e Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano

We present a new homogeneous method of time-resolved fluoroimmunoassay for theophylline (Th). This widely used in asthma treatment but its therapeutic range is very narrow (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ). This method is based on the lysis of liposomes containing a tracer, in response to attack by the mastoparan ( Mast ), a 14 aminoacids polypeptide with potent cytolytic action. Then we prepared unilamellar liposomes, which trapped terbium citrate. For the cytolytic agent we synthesized the Th-Mast conjugate. Because the specific anti-Th antibody inactivates the cytolytic activity after binding to the conjugated hapten, then competition between Th-Mast and the free analyte Th results in a correlation between the concentration of analyte and the release of the tracer. The time-resolved fluorescence of the complex (dipicolinic acid $\rightarrow\text{Tb}^{3+}$ ) is read in solution in an excess of dipicolinic acid added after incubation ( $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$ , delay time = 500  $\mu\text{sec}$ ). A dose response curve was obtained with this method between 10 ng and 10  $\mu\text{g}$  of Th.

## G003

Dotti G., Marinoni R., Perrucci V., Leone L., °Di Leo M., °Ansaldo N., \*Weisz G., ^Paciello F.

MALATTIA CELIACA: ANTICORPI ANTIENDOMISIO VERSUS ANTICORPI ANTI tTG

Laboratorio di analisi chimico-cliniche e microbiologia. Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S.Anna - ^Servizio di Immunoematologia e Trasfusione - Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S.Anna - °Servizio di Gastroenterologia Pediatrica dell'Università di Torino - \*Laboratorio di analisi chimico-cliniche. Ospedale Martini Nuovo - Torino

La malattia celiaca rappresenta la più frequente causa di malassorbimento: non sempre i sintomi sono caratteristici: possono essere extraintestinali, assenti o presenti ma associati ad altre malattie autoimmuni; l'esame istologico della mucosa digiunale è il criterio diagnostico fondamentale, è indispensabile quindi disporre di tests poco invasivi, ma affidabili, per valutare quali pazienti inviare alla biopsia digiunale.

Scopo del lavoro è confrontare anticorpi antiendomisio (EMA), anticorpi antigliadina (AGA) di tipo IgA ed IgG ed autoanticorpi anti transglutaminasi (tTG), valutando se questi ultimi, che si determinano in ELISA potranno sostituire gli EMA determinati in immunofluorescenza e quindi più soggetti alla variabilità legata all'interpretazione individuale.

Per l'esecuzione dei tests sono stati utilizzati per EMA test in immunofluorescenza indiretta (IFI) kit AEA prodotto da BIOSYSTEM e distribuito da BIOTECH, per AGA IgG e IgA il metodo immunoenzimatico ELISA kit prodotto da RADIM, per gli autoanticorpi anti tTG metodo immunoenzimatico ELISA kit Eu tTG prodotto da EUROSPITAL .

Pazienti e risultati dei tests:

	PAZIENTI CELIACI				CONTROLLI	
	EMA	AGA IgA	AGA IgG	tTG	EMA	tTG
+	293	166	181	97	8	9
-	3	29	17	2	728	147

Sensibilità, specificità e valori predittivi di AGA IgA, IgG, EMA e ab anti tTG (%)

	AGA IgA	AGA IgG	EMA	tTG
SENSIBILITA'	85.1	91.4	99.3	97.9
SPECIFICITA'	70.6	54.1	98.9	94.2
VAL. PRED. POS.	86.9	82.3	97.4	91.5
VAL. PRED.NEG.	67.4	73.0	99.6	98.6

In conclusione per la diagnosi di malattia celiaca l'accuratezza degli EMA è lievemente superiore rispetto a quella degli anticorpi anti tTG, tuttavia il metodo di immunofluorescenza per la determinazione degli EMA è più indaginoso e più soggetto ad interpretazioni individuali rispetto a quello ELISA per la determinazione degli anticorpi anti tTG, di conseguenza anticorpi anti tTG potrebbero essere preferibili per lo screening di popolazione.

## G004

Signò P., Soldini L., Tradati P., Murone M.

FLOW-COUNT™ FLUOROSPHERES SYSTEM FOR FLOW CYTOMETRIC ABSOLUTE COUNT DETERMINATION OF LYMPHOCYTE SUBSETS.

Laboratorio analisi, Centro San Luigi, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano.

The aim of the study is to present the assessment of the Flow-Count™ Fluorospheres System (Coulter – Miami, FL) according to the European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) protocol. This is a new technology for “direct” absolute count determination of lymphocyte subsets using flow cytometric analysis. In this method the same volume of whole blood and Flow-Count™ Fluorospheres were mixed. Cells, marked by specific monoclonal antibodies (Cyto-Stat TetraCHROME CD45/CD4/CD8/CD3 – Coulter), and fluorospheres were counted by a flow cytometric system (Epics XL – Coulter). Since the concentration of fluorospheres is known, the absolute count can be obtained by a simple arithmetic formula. We compared the results with those of a standard “indirect” method, which, for lymphocyte absolute count, combines data of hemocromocytometric test with those of flow cytometric immunophenotyping analysis.

Performance evaluation included method comparison, at 3 different levels for 3 different lymphocyte subpopulations (CD4, CD8, CD3), within and between run imprecision and linearity test. Our study showed good correlation between the 2 systems in each level and subset (CD4,  $0.94 < r < 0.98$ ; CD8,  $0.92 < r < 0.96$ ; CD3,  $0.92 < r < 0.99$ ). The new method, always, obtained satisfactory results for within and between run imprecision (maximum within run CV 3.68% and between run CV 6.36%) and a good performance for linearity tests ( $0.95 < r < 0.99$ ;  $1.02 < b < 1.10$ ). In general, the “direct” system evidenced a good correlation to the traditional “indirect” method, satisfactory analytical performance, and could be a tool to improve standardisation and interlaboratory variation, a very important goal for flow cytometric analyses.

- Rumke CL. Imprecision of the ratio-derived differential leukocyte counting. Blood cells 1995; 11: 311-314.

## G005

Conti A.\*, Postiglione L.\*, Chiacchio M.\*, Acquaviva R.\*, Rossi G.\*, Spadaro G.\*\*\*, Morelli D.\*\*\*, Maglione V.\*\*\*, Marone G.\*\*

DIAGNOSTICA IN VIVO E IN VITRO DELL'ALLERGIA AL LATTICE: STUDIO EPIDEMIOLOGICO SU OPERATORI SANITARI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI.

\*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano". \*\*Cattedra di Immunologia Clinica e Allergologica. Università degli Studi di Napoli "Federico II". Fac. Medicina e Chirurgia

Negli ultimi anni si è verificato un significativo aumento delle patologie allergiche professionali correlato all'esposizione a materiali contenenti derivati del lattice, verosimilmente dovuto ad un più frequente ed esteso impiego di tali materiali in presidi sanitari quali guanti di gomma, nonché all'aumento dell'inhalazione di particelle di lattice presenti nell'aria delle aree urbane derivanti dall'usura dei pneumatici(1).

È stata, pertanto, condotta un'indagine epidemiologica fra gli operatori sanitari della AUP Federico II di Napoli, in quanto lavoratori professionalmente esposti al lattice, allo scopo di valutare l'incidenza di manifestazioni allergiche correlate alla sensibilizzazione ai molteplici componenti del lattice, con uno studio sia *in vivo* che *in vitro*. Sono stati reclutati 135 (57 maschi e 78 femmine) operatori sanitari, previa richiesta di firma di consenso informato, sottoposti ad anamnesi patologica, familiare e personale, visita medica generale, "prick-test" verso il lattice e verso alcuni alimenti cross-reagenti del lattice e comuni allergeni inalanti, dosaggio su siero delle IgE totali e specifiche (UNICAP-Pharmacia & Upjohn) per il lattice e per gli stessi allergeni testati *in vivo* con i tests cutanei. Sono state, inoltre, dosate le IgE totali e specifiche in un gruppo di controllo di 118 soggetti clinicamente sani (83 maschi e 35 femmine), volontari donatori di sangue afferenti al Centro Trasfusionale della AUP.

I risultati sperimentali relativi ai dosaggi *in vitro* delle IgE totali e allergene-specifiche eseguiti su tutti i soggetti studiati dimostrano che il 31% degli operatori della AUP ed il 32% del gruppo di controllo hanno valori di IgE totali al di sopra del limite di riferimento (100 KU/l), che 7 soggetti, tutti appartenenti al gruppo degli operatori sanitari, sono positivi al dosaggio delle IgE specifiche per il lattice e verso uno o più allergeni cross-reattivi presenti in alcuni alimenti. Tutti i soggetti positivi *in vitro* per le IgE-latex sono positivi ai tests cutanei; al contrario, gli operatori sanitari positivi solo ai tests cutanei sono più numerosi (N= 21). La successiva ricerca delle IgE specifiche verso gli allergeni cross-reattivi in questi soggetti non ha evidenziato alcuna positività.

K. Turjanmaa, T. Palosuo, et al.: "Latex diagnosis: *in vivo* and *in vitro* standardization of a natural rubber latex extract" *Allergy*, 52:41-50 (1997)

## G006

Vano M., Busi C.

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-NUCLEO MEDIANTE TEST IMMUNOENZIMATICI PER ANA-SCREENING E dsDNA (ENEASYSTEM III)

Laboratorio Analisi, Presidio Ospedaliero di Sora (FR), ASL Frosinone.

La ricerca di anticorpi anti-nucleo mediante metodiche immunoenzimatiche sta acquisendo sempre maggiore diffusione nei Laboratori clinici, grazie alla possibilità offerta da questa tecnica di effettuare un notevole numero di analisi con un ridotto carico di lavoro e con una refertazione obiettiva dei risultati, indipendenti dalla valutazione soggettiva dell'operatore.

L'affiancamento di ogni nuova metodica in Laboratorio richiede comunque una accurata valutazione rispetto al metodo di riferimento, al fine di determinare la validità e l'affidabilità del nuovo metodo, e definirne le condizioni di migliore utilizzo.

Abbiamo valutato, su una ampia casistica di sieri precedentemente caratterizzati in immunofluorescenza (ANA), immunoblotting (ENA) e ELISA (dsDNA), provenienti da pazienti con quadro clinico ben definito, le performances analitiche di un test per ANA-screening, con fase solida sensibilizzata con SSA, SSB, Jo-1, Sm, Sm/RNP, Scl-70, CENP-B e dsDNA, e di un test specifico per dsDNA, entrambi della ditta Bioallergy. Entrambi i test utilizzano un preparazione di dsDNA sintetico. I dosaggi sono stati eseguiti su strumento dedicato (ENEASYSTEM III), in completa automazione.

I risultati sono stati valutati al fine di definire per entrambi i livelli di cut-off che fornissero la migliore sensibilità e specificità. Vengono analizzati e discussi i livelli di cut-off risultati ottimali nonchè la sensibilità del test di screening in presenza di sieri monopositivi o positivi per più parametri.

### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

## G007

De Nicola A.M., Lovato G.

### VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI CUT-OFF PER LO SCREENING ANA CON IL NUOVO SISTEMA ENEASYSTEM III-BIOALLERGY

Laboratorio Analisi - Presidio Ospedaliero di Velletri (RM)  
- ASL RM/H

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il cut-off clinico dello screening ANA in immunoenzimatica, utilizzando il sistema ENEASYSTEM III della ditta Bioallergy.

Abbiamo utilizzato per il nostro studio 50 sieri tipizzati sia clinicamente che con altre metodiche utilizzate nel nostro laboratorio.

Gli antigeni sono coattati su una fase solida innovativa monotest denominata A.C.E. (Antigen Chamber Enzymatic). La metodologia è immunoenzimatica a sandwich con rilevazione colorimetrica

La standardizzazione è ottenuta mediante l'utilizzo di curve master memorizzabili, la cui calibrazione può essere effettuata durante il run-test con l'impiego di 2 ricalibratori a locazione fissa sul piano di lavoro.

ENEASYSTEM III è uno strumento compatto, completamente automatico dalla diluizione e dispensazione del siero da provetta madre, con lettura di bar-code, alla stampa dei risultati.

ENEASYSTEM III è in grado di processare fino a 30 campioni con accesso random per un totale di 150 tests, per seduta analitica, con una produttività oraria di 100 tests/ora. Possiede inoltre la capacità di esecuzione dei tests con tre differenti antisieri per un massimo di 19 parametri per seduta analitica.

E' possibile inoltre l'impiego di controlli specifici a locazione fissa con l'elaborazione del CQ interno allo strumento.

In base ai risultati ottenuti, al fine di ottimizzare sia la sensibilità che la specificità del test in esame, abbiamo ritenuto opportuno adottare un valore di cut-off pari a 2 U/ml, con una zona grigia fino a 5 U/ml.

I risultati analizzati secondo questo criterio dimostrano un'elevata sensibilità e specificità di questo nuovo metodo con un'ottima correlazione tra il dato clinico e quello laboratoristico. Inoltre l'ENEASYSTEM III si integra perfettamente nella routine di laboratorio, migliorandone l'aspetto organizzativo ed operativo.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

## G008

Rosa L., Natale A., Di Zenzo P.

### ENEASYSTEM III – BIOALLERGY: VALUTAZIONE DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI CON METODICA IMMUNOENZIMATICA

Policlinico Militare A. Friggeri, Piazza Celimontana n.50  
Roma.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il sistema automatizzato ENEASYSTEM III della ditta Bioallergy applicato alla nostra routine.

Nell'ottica di una ristrutturazione della nostra sezione di sierologia, necessaria al fine di ottimizzare le nostre risorse, si rendeva indispensabile organizzare le sedute operative, concentrando più parametri possibili su di un solo strumento, ovvero ANA screen, DNA, Istoni, Centromero, ENA screen, SSA-Ro, SSB-La, Jo1, Scl70, Sm, Sm/RNP, Cardiolipina,  $\beta$ 2 Glicoproteina, Tiroide (anti-Tg, TPO), Giadina.

Cuore dell'ENEASYSTEMIII è la fase solida a cui sono adesi gli antigeni, denominata A.C.E. (Antigen Chamber Enzymatic). La metodica impiegata è immunoenzimatica con sistema di rilevazione di tipo fotometrico.

L'ENEASYSTEM III possiede inoltre le seguenti caratteristiche:

- Accettazione dei pazienti in continuo.
- Accesso ed esecuzione random.
- Completa automazione dallo *start-up* alla refertazione.
- Provetta primaria con identificazione del bar-code.
- Curve master con ricalibrazione a 2 punti per seduta.
- Gestione automatica del QC intralab.
- Elevata produttività: 150+150 tests per seduta in 1,5h+1,5h.

Tali caratteristiche garantiscono piena soddisfazione delle nostre esigenze con grande risparmio di tempo e di manualità.

Da un'analisi dei risultati abbiamo ottenuto un'ottima affidabilità clinica ed un'ottima riproducibilità in confronto sia con la clinica che con l'immunofluorescenza in uso presso la nostra sezione.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

## G009

Iacovazzi P.A.<sup>o</sup>, Caroppo E.\*<sup>o</sup>, D'Amato G.\*<sup>o</sup>, Barletta D.<sup>o</sup>, De Michele G.<sup>o</sup>, Correale<sup>o</sup> M.

### VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI 90K NEL PLASMA SEMINALE DI PAZIENTI INFERTILI

<sup>o</sup>U.O. di Patologia Clinica, \*U.O. di Fisiopatologia della Riproduzione Umana, I.R.C.C.S. "S. De Bellis", Via della Resistenza, 70013 Castellana Grotte (BA).

Recentemente alcuni autori hanno studiato diversi fattori dosabili nel plasma seminale nell'intento di dimostrare il loro ruolo nella regolazione paracrina della funzione testicolare. La 90K è una glicoproteina circolante, che appartiene alla S.R.C.R. superfamily i cui componenti sono coinvolti nell'attivazione dell'immunità cellulo-mediata. Inoltre l'analisi del cDNA di 90K ha evidenziato una sequenza identica a quella della MAC-2BP, un ligando naturale della Galectina 3 coinvolta nella crescita cellulare, differenziazione, infiammazione, trasformazione e nelle metastasi, mediante interazione con specifici ligandi.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare i livelli di 90K nel plasma seminale di pazienti affetti da infertilità di coppia. Sono stati studiati 40 pazienti infertili di cui 16 con parametri seminali normali, 8 con azoospermia e 16 con oligozoospermia severa. I campioni seminali sono stati ottenuti dopo 3-4 giorni di astinenza sessuale per la valutazione del numero di spermatozoi, della motilità e della morfologia, in accordo con i criteri sanciti dalla WHO. I livelli di 90K nel plasma seminale sono stati misurati con metodo ELISA (DIESSE, Italia) dopo centrifugazione a 2000 r.p.m. per 10 minuti. Sono stati valutati, inoltre, i livelli sierici di testosterone in 14 dei 24 pazienti infertili con azoospermia o oligozoospermia severa, utilizzando un metodo RIA. I livelli di 90K nel plasma seminale sono risultati più alti nei soggetti con parametri seminali normali rispetto a quelli con indici di ipospermatogenesi, ma la differenza non è risultata statisticamente significativa (Anova,  $p=0.17$ ). D'altra parte, i livelli sierici di testosterone sembrano correlare con i livelli di 90K nel plasma seminale.

E' noto che il testosterone esercita, a livello intratesticolare, un ruolo immuno modulatore, come confermato dal rilievo di patologie autoimmunitarie testicolari nella Sindrome di Klinefelter. La correlazione riscontrata tra i livelli sierici di testosterone e seminali di 90K ( $r=0.64$ ,  $p=0.02$ ) suggerisce che la glicoproteina nel plasma seminale umano possa giocare un ruolo importante nell'immunosorveglianza intratesticolare.

## G010

De Franceschi M.<sup>1</sup>, Bamonti-Catena F.<sup>1</sup>, Novembrino C.<sup>1</sup>, Cavalca V.<sup>2</sup>, Pomati M.<sup>1</sup>, Naggi P.<sup>1</sup>, Ciani A.<sup>1</sup>, Brambilla G.<sup>3</sup>

### VALUTAZIONE ANALITICA DEL NUOVO METODO PER-OX (IMMUNDIAGNOSTIK AG, GERMANIA) PER IL DOSAGGIO DEI PEROSSIDI

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Mediche, Ospedale Maggiore-IRCCS; <sup>2</sup>Istituto di Cardiologia; <sup>3</sup>Istituto di Medicina del Lavoro, Università di Milano, Milano, Italia

I metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs), attraverso processi di perossidazione, formano, nel sangue e nelle cellule, dei derivati altamente reattivi, coinvolti in importanti alterazioni patologiche (cardiovascolari, aterosclerotiche, neurodegenerative, neoplastiche etc.) e processi infiammatori. La presenza dei ROMs, valutata finora tramite i prodotti di degradazione della perossidazione lipidica (ad. es. malondialdeide), potrebbe essere determinata direttamente con un metodo reso recentemente disponibile per il dosaggio dei perossidi (perox).

Scopo: valutare la performance analitica di un nuovo dosaggio fotometrico automatizzato (Per-Ox, Immunodiagnostik) per misurare i perox in campioni biologici.

Materiali e metodi: campioni di sangue periferico erano prelevati, a digiuno, da 10 volontari sani e centrifugati rigorosamente a 30 minuti dal prelievo. I campioni di siero venivano stoccati, in replicati, a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento del dosaggio. La determinazione dei perox veniva effettuata attraverso la reazione della perossidasi con i perossidi presenti nel campione, seguita dalla conversione del TMB a prodotto colorato; la lettura dei campioni a 450 nm veniva effettuata con il lettore di micropiastre (Medgenix). La valutazione analitica era eseguita considerando i parametri caratteristici, come già effettuato (1) per altri metodi. Non era possibile, in questo caso, un confronto con un metodo di riferimento.

Risultati: Le imprecisioni intra- ed inter-assay, determinate come CV% su 12 replicati di un campione a concentrazione media di perox, erano 3.9 e 8.2 rispettivamente. La linearità, determinata con 8 diluizioni ottenute mescolando aliquote di siero ad alta e bassa concentrazione di perox (323 e  $47.3\ \mu\text{mol/L}$ ), risultava buona in tutto l'intervallo. Il limite di rilevanza, determinato con diluizioni scalari di un campione con concentrazione di perox di  $320.7\ \mu\text{mol/L}$ , era di  $7\ \mu\text{mol/L}$ . Entrambe le precedenti misurazioni davano un recupero del 95% e 96% rispettivamente. L'esigua casistica considerata non consentiva di produrre l'intervallo di riferimento, tuttavia la concentrazione di perox dei campioni era  $<350\ \mu\text{mol/L}$ , cut-off fornito dalla ditta produttrice.

Conclusioni: dai nostri risultati emerge che il dosaggio è attendibile, di facile esecuzione e di possibile utilizzo nella diagnostica clinica dello stress ossidativo.

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

## G011

Del Ry S., Giannessi D., \*Caprioli R, Rizza A., Trianni G., Botto N., Clerico A.

### DETERMINATION OF N-TERMINAL PROANP IN PLASMA AND CARDIAC TISSUE EXTRACTS: COMPARISON OF COMPETITIVE AND NON-COMPETITIVE IMMUNOASSAYS

CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa and Medical Centre G. Pasquinucci, Massa, Italy, \*Department of Nephrology, S. Chiara Hospital, University of Pisa, Pisa, Italy.

Assay of N-terminal proANP peptides is considered a useful marker of impaired ventricular function in patients with cardiac diseases and a prognostic indicator for risk stratification after myocardial infarction. We compared the analytical performance and clinical usefulness of the immunoassay methods for ANP, measured with a sandwich IRMA system, and the N-terminal proANP peptides, determined with 3 different immunoassays: one sandwich non-competitive [proANP ELISA (1-98)] and two competitive enzyme-immunoassay methods [proANP EIA (1-30) and proANP EIA (31-67)]. The circulating levels of N-terminal proANP peptides are greatly higher than those of ANP (more than 100 times). We measured plasma levels of cardiac natriuretic peptides in healthy volunteers (N, n=67) and in patients with cardiac (HF, n=41) or renal failure on chronic hemodialysis (RF, n=51); the results (mean±SEM, pmol/L) are reported in the Table.

	Pro-ANP <sub>1-98</sub>	Pro-ANP <sub>1-30</sub>	Pro-ANP <sub>31-67</sub>	ANP
N	731±628	637±338	1224±849	7.9±10
HF	4807±2543	1764±1196	2913±3014	28.3±29
RF	15584±11780	7647±3361	14990±6416	45.4±37

We also measured the peptide content in cardiac tissue extracts (atrium dx) of 15 patients with coronary disease undergone to aorto-coronary by pass operation. ELISA proANP and IRMA ANP showed more similar results, while the two competitive EIA methods significantly higher values. Our data indicate that the ELISA method is more suitable than the competitive EIA methods for the determination of the intact N-terminal Pro-ANP<sub>1-98</sub> in plasma samples of patients with heart or renal failure and cardiac tissue extracts, because this non-competitive technique discriminated better the normal group from the groups of patients with cardiac and renal failure.

## G012

Chigorno V., Mauri L., Casellato R., Sonnino S.

### SINTESI DI UN GLICOPOLIMERO ANFIFILICO PER IL DOSAGGIO DEL TITOLO SERICO DI ANTICORPI ANTI-OLIGOSACCARIDI MEDIANTE ELISA.

Dipartimento di Chimica e Biochimica Medica, Università di Milano, Via F. Cervi 93, 20090 Segrate (Mi)

Anticorpi anti-oligosaccaridi sono presenti nei sieri di pazienti con malattia del motoneurone e neuropatie. I gangliosidi sono largamente utilizzati come antigeni per il dosaggio di anticorpi anti-oligosaccaridi mediante ELISA. La variabilità del dosaggio è particolarmente elevata a conseguenza del fatto che la maggior parte dei gangliosidi inizialmente assorbiti nei pozzetti delle piastre da microtitolazione è rimossa durante le varie fasi del dosaggio. Abbiamo disegnato un glicopolimero anfifilico con caratteristiche antigeniche che per le sue caratteristiche strutturali dovrebbe restare strettamente associato alla plastica, per mezzo di una rete di interazioni idrofobiche, permettendo una più alta precisione del dosaggio. Questo antigene saccaridico deriva dal poli{2-[(imidazolil)formilossi]etilmetacrilato}, ed è utilizzabile per reazioni di scambio con gruppi amminici e alcolici presenti sulle molecole. E' quindi possibile inserire sul polimero antigeni oligosaccaridici reduttaminati a differente struttura (e densità finale) e amine alifatiche per l'ancoraggio alla plastica delle piastre per microtitolazione.

Il 2-[(imidazolil)formilossi]etilmetacrilato (HEMA-Im), un derivato attivato dell'acido metacrilico, è stato sintetizzato per reazione tra 2-idrossietilmetacrilato e N,N'-carbonildiimidazolo in cloroformio anidro. HEMA-Im è stato polimerizzato in presenza di 2,2'-azoisobutirronitrile come catalizzatore. Il primo glicopolimero è stato sintetizzato per essere utilizzato per il dosaggio di un anticorpo largamente diffuso e noto come anti-GM1 che riconosce specificamente il disaccaride Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ . Il 10% dei gruppi attivi del polimero è stato sostituito con l'oligosaccaride Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4(Neu5Ac $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-(CHOH-CH<sub>2</sub>OH)CH-CHOH-CHOH-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> preparato per ozonolisi del ganglioside GM1 in metanolo, seguita da  $\beta$ -eliminazione in condizioni alcaline e reazione di reduttaminazione con acetato d'ammonio. Un altro 10% dei gruppi attivi del polimero è stato sostituito dall'octadecilammina. I gruppi attivi residui sono stati quindi neutralizzati per reazione con etilammina. Il glicopolimero è stato caratterizzato per spettroscopia di NMR, spettrometria di massa e misure di laser light scattering. Dati preliminari ottenuti analizzando le varie fasi degli ELISA suggeriscono una forte associazione del glicopolimero alla plastica dei microtitolatori.

## G013

Martelloni M.\*, Berni R.\*, Puccetti C.\*, Metelli M.R.\*, Talini I.°, Giordani R.\*

### ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI TISSUTALE: VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST DIAGNOSTICO PER LA MALATTIA CELIACA

\*Laboratorio Analisi Specialistiche, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italia.

°Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italia.

La determinazione degli anticorpi anti-endomisio di classe IgA (EMA), degli anticorpi IgA anti-gliadina (AGA-IgA) e IgG anti-gliadina (AGA-IgG) sono considerati i migliori tests sierologici per la malattia celiaca.

Recentemente è stato dimostrato che il bersaglio antigenico degli EMA è la transglutaminasi tissutale (tTG), un enzima calcio dipendente che utilizza come substrato preferenziale la gliadina.

Lo scopo del nostro studio è stato di valutare l'efficienza diagnostica della tTG e la correlazione fra i tests di riferimento più usati (EMA ed AGA) e il test di rilevamento di anticorpi IgA diretti contro la transglutaminasi tissutale. Sono stati esaminati 26 campioni di siero provenienti da soggetti pediatrici di età compresa tra 1 e 14 anni ( $7 \pm 1.4$  anni). Tutti i soggetti sono stati sottoposti alla ricerca degli AGA-IgA e AGA-IgG con metodo fluoroimmunoenzimatico (Immunocap-Pharmacia & Upjohn), degli EMA con metodo immunofluorescenza indiretta (Euroimmun-GmbH) ed alla determinazione quantitativa del tTG-IgA con metodo immunoenzimatico (Eurospital S.p.a.).

Di questi, 11 soggetti erano affetti da morbo celiaco (sintomatologia tipica e biopsia positiva), 3 avevano gli esami eseguiti dopo dieta.

È risultata una concordanza del 91% tra EMA e tTG e l'unico caso con valore di tTG-IgA risultato negativo è molto vicino al cut off considerato (4 UA contro i cut off di 5 UA).

Nei 3 soggetti esaminati dopo dieta si riscontrarono, in 2 casi valori positivi di AGA-IgA e in tutti e 3, valori positivi AGA-IgG; 10 soggetti presentavano diagnosi incerta (biopsia incerta etc.); questi casi hanno presentato positività per EMA = 3/10, per AGA IgA = 6/10, per AGA IgG = 6/10, per tTG = 5/10.

I 5 soggetti rimanenti sono stati considerati non affetti (sintomatologia atipica) presentando tutti EMA e tTG negativi e solo 1 caso AGA IgG positivo e in un altro AGA IgA positivo.

I dati ottenuti da questa indagine preliminare, dimostrano una correlazione sia per positività che negatività tra Ema e tTG, e confermano la validità del nuovo test da inserire nella diagnostica per lo screening del morbo celiaco.

## G014

Petralia A., De Pasquale C., Caraci F., Sambataro F., Meli G.A., Nicoletti V.G.\*, Giuffrida Stella A.M.\*, Rapisarda V.

### AZIONE IMMUNOMODULANTE ED EFFICACIA TERAPEUTICA DEGLI OMEGA-3 NEL TRATTAMENTO DELLA DEPRESSIONE MAGGIORE

Clinica Psichiatrica - Università di Catania; \*Sez. di Biochimica e Biol. Molecolare - Dip. di Scienze Chimiche - Università di Catania, V.le A. Doria 6.

Nel corso degli ultimi anni una crescente importanza è stata attribuita alle alterazioni del sistema immunitario nell'insorgenza e nel decorso della depressione maggiore. La disinibizione funzionale dell'asse HPA e la conseguente azione inibitoria dei corticosteroidi sulla produzione delle citochine potrebbero spiegare la diminuita produzione di IL-1 e IL-2 che si osserva in molti pazienti depressi. A sua volta la diminuita produzione di citochine può essere considerata responsabile delle alterazioni del sistema immunitario che si osservano nella depressione.

In relazione a queste nuove acquisizioni sulle alterazioni dei parametri immunitari nella depressione maggiore si è scelto di saggiare "in vivo" il possibile effetto immunomodulante che gli acidi grassi polinsaturi  $\omega$ -3 (EPA = Acido eicosapentenoico e DHA= Acido docosaesanoico) esercitano "in vitro" sull'attivazione dei linfociti Th1 e quindi sulla produzione di IL-2 (Wallace 1999). Sono state analizzate in parallelo le variazioni di IL-2 (attivazione dei linfociti Th1) e IL-10 (attivazione dei linfociti Th2) in pazienti trattati con  $\omega$ -3. Questi ultimi, peraltro, sono direttamente coinvolti nella patogenesi della Depressione Maggiore. Una significativa riduzione dei PUFA  $\omega$ -3 totali, dell'acido alfa-linolenico e dell'acido eicosapentenoico è stata infatti riportata in pazienti con Depressione Maggiore rispetto ai controlli sani (Maes 1996).

Un campione di 10 pazienti affetti da Depressione Maggiore è stato diviso in due gruppi di 5: il primo trattato con 3g/die di PUFA  $\omega$ -3 mentre il secondo è stato trattato sia con  $\omega$ -3 (3g/die) che con fluvoxamina (150 mg/die), entrambi per 6 settimane. Per valutare l'entità del miglioramento clinico è stata somministrata l'Hamilton Rating Scale e sono stati dosati i livelli di IL-2 e IL-10 mediante ELISA su campioni di plasma. In entrambi i gruppi è stato osservato un incremento dell'IL-2, mentre l'IL-10 risultava incrementata nel primo gruppo e diminuita nel secondo. Un miglioramento clinico significativo è stato osservato nel gruppo che ha ricevuto solo  $\omega$ -3. Gli  $\omega$ -3 assumono quindi un ruolo chiave non solo nell'insorgenza, ma anche nella terapia della Depressione.

#### Bibliografia

Maes et al. J Affect Disord. 38:35-46, 1996.  
Wallace et al. Lipids, 34 Suppl: S251, 1999.

## G015

Bevilacqua N.\*, Grande G.\*, Nappa P.\*, De Blasi A.\*, Balzano A.°

### LE CITOCHINE ANTI E PRO-INFIAMMATORIE NELLA RETTOCOLITE ULCEROSA (RCU)

\* Laboratorio Centrale A.O.R.N. A. Cardarelli,

° Servizio di Anatomia Patologica - ° Divisione di Gastroenterologia-Napoli

I dati della letteratura sembrano indicare che in corso di RCU si verifichi uno sbilanciamento fra citochine anti e pro-infiammatorie a favore di queste ultime, in particolare, nelle fasi di riacutizzazione della malattia. Si presenta la nostra casistica per contribuire a chiarire il comportamento delle citochine in corso di RCU.

Sono stati arruolati 20 pazienti con RCU attiva (RCU-A) e 9 con RCU quiescente (RCU-Q). A ciascun paziente è stato attribuito, in base al riscontro istologico, uno score da 1 a 3 in rapporto alle caratteristiche dei fenomeni infiammatori (densità, sede e caratteristiche dell'infiltrato, disposizione diffusa o follicolare, eventuale danno ghiandolare). Un altro gruppo di 7 pazienti con patologie intestinali non infiammatorie, è stato utilizzato come controllo. Nei campioni di siero provenienti da ciascun paziente è stata determinata in triplicato la concentrazione di IL6, sIL2-R, TNF $\alpha$ , IL8 e IL10, con metodica immunoenzimatica EASIA (Medgenix - Belgio). In tabella sono riportate le mediane (e il range 25-75 percentile) delle concentrazioni delle singole citochine studiate.

	Controlli			RCU-Q			RCU-A		
IL6	8	12	79	8	13	16	10	18	30
sIL2R	68	136	687	224	644	130	240	578	179
						7			5
IL8	11	58	337	8	17	80	12	21	50
IL10	2,8	7,1	13,9	1,9	4,8	8,4	2,3	5,3	7,8

TNF $\alpha$  è risultato presente a livelli dosabili soltanto in 2 casi di RCU-A ed in 1 Controllo e per questo motivo non inserito in tabella. sIL2-R risulta aumentata in modo significativo solo nelle RCU-A rispetto ai controlli ( $p=0.046$  al Mann-Whitney). Inoltre, una significativa ( $p < 0.05$ ) correlazione inversa tra score istologico e livelli di IL10 circolante è stata evidenziata al test di Spearman. Il comportamento di IL8, che raggiunge le sue maggiori concentrazioni circolanti nei soggetti di controllo, sembra spiegabile alla luce del fatto che i pazienti con RCU ricevevano una terapia steroidea o con 5'ASA. Le stesse considerazioni potrebbero valere per i livelli di IL6 che si mantengono pressoché invariati nei 3 gruppi di pazienti in esame. Ci sembra di poter concludere che mentre il dosaggio di sIL2R potrebbe essere un indicatore dell'attività della malattia, l'IL10 potrebbe essere suggestiva dell'entità dell'infiammazione a livello della mucosa intestinale.

## G016

Cremašchi A., Barzanò E., Biancini V., Gatti O., Perletti L., Vitaloni R.

### VALUTAZIONE DEL POSSIBILE INQUINAMENTO DA SALIVA NEL DOSAGGIO DEL CEA SU AXSYM ABBOTT

Laboratorio Analisi, Ospedale di Treviglio (BG)

**INTRODUZIONE:** Nello strumento AXSYM la parte di caricamento dei campioni è esposta agli agenti atmosferici. Il non corretto utilizzo dell'apparecchiatura potrebbe determinare il possibile inquinamento da saliva delle coppette di diluizione. Il contenuto di marcatori mucinici e specialmente di CEA nella saliva risulta particolarmente elevato, e la saliva pertanto rappresenta un potenziale inquinante, tale da determinare valori falsamente positivi. **SCOPO:** Scopo del presente lavoro è la valutazione del possibile inquinamento da saliva nella determinazione del CEA sullo strumento AXSYM della ditta ABBOTT.

**MATERIALI E METODI:** La sperimentazione è stata condotta su 10 kits di CEA AXSYM ABBOTT di lotto omogeneo, confrontati col kit CEA IMMULITE 2000 DPC. La sperimentazione ha previsto il dosaggio del CEA nei sieri provenienti dalla routine inizialmente sullo strumento IMMULITE 2000, e subito in successione sullo strumento AXSYM con esecuzione in doppio. Il personale ha lavorato usando guanti, visiera, e coprendo le cellette portacampione con gli appositi coperchi.

**RISULTATI:** Sono stati testati 463 campioni. È stata eseguita la correlazione fra la serie ottenuta con IMMULITE 2000 e le due serie ottenute su AXSYM. È stata inoltre effettuata la correlazione fra le due serie ottenute su AXSYM e ne è stato calcolato il  $t$  di Student. È stato valutato il profilo di imprecisione su 462 campioni, escludendo l'unico aberrante, ed inoltre l'imprecisione tra-serie su 3 pool di sieri a diverse concentrazioni.

**CONCLUSIONI:** Nel corso della sperimentazione si è avuto un solo valore aberrante, che lo strumento ha messo in *eccezione*, per il quale si presume un difetto di campionamento. La correlazione del metodo AXSYM col metodo IMMULITE 2000 è soddisfacente, anche se si osserva un'intercetta positiva di IMMULITE 2000 vs AXSYM. L'imprecisione tra-serie dimostra un aumento di CV% ai valori bassi, mentre ai valori medio alti si contiene al di sotto del 4%, confermando l'andamento del profilo d'imprecisione. Dall'esame del profilo d'imprecisione si osservano su alcuni campioni, comunque compresi al di sotto di 2 ng/mL, CV% > 10. Possiamo concludere per una soddisfacente performance del test CEA AXSYM. Poiché i dati di imprecisione si possono ritenere relativi al metodo, è possibile concludere per l'esclusione di inquinamento da saliva utilizzando i presidi di protezione personale e strumentale.

## G017

Stefini F., Bonetti G., Pagani F., Panteghini M.

### EVALUATION OF INTERFERENCE EFFECTS FROM HETEROPHILIC ANTIBODIES (HA) IN FOUR COMMERCIAL PLATFORMS FOR CARDIAC MARKER MEASUREMENT

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

The presence of high titers of HA in serum can lead to analytical errors in "sandwich" immunoassays by cross-linking the capture and label antibodies in the absence of specific analyte. These dual-site antibody-based immunoassays are commonly used to quantitate sensitive and specific cardiac proteins in serum, i.e. CK-MB, myoglobin (Myo), and troponins (TnI and TnT). HA can therefore interfere with these assays and produce erroneous results. The aim of this study was to compare four commercial platforms (Bayer ACS, Beckman Access, Dade Opus, and Roche Elecsys) for CK-MB, Myo, and TnI/TnT in the presence of heterophilic human plasma with/without pretreatment using heterophilic blocking tubes (HBT) (Scantibodies Laboratory). Two positive HA samples (HA-22 and HA-27) were analyzed in duplicate. Treatment of samples with HBT was performed according to the manufacturer's instructions. The following results ( $\mu\text{g/L}$ ) were obtained:

Assay	HA-22		HA-27	
	Untreat.	Treat.	Untreat.	Treat.
ACS MB	2.5	2.3	1.4	0.8
ACS Myo	51	51	35	33
ACS TnI	0.27	<0.15	<0.15	<0.15
Access Myo	79	29	79	14
Access TnI	0.02	<0.01	<0.01	<0.01
Opus MB	3.7	4.0	<0.6	<0.6
Opus Myo	30	31	17	16
Opus TnI	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Elecsys MB	2.5	2.4	0.8	0.8
Elecsys Myo	49	49	33	31
Elecsys TnT	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Only Access Myo (manufacturer's recommended cutoff, 70  $\mu\text{g/L}$ ) gave increased results on both HA samples, with significantly decreased values after treatment with HBT, demonstrating significant interference from HA. The other assays gave results essentially below the cutoffs recommended by each of the manufacturers and HBT did not significantly alter the values. Although in this instance it appears that only Access Myo was sensitive to the HA interference, it may be that the HA samples selected for this study are not appropriate to completely elucidate the existence of a HA interference. Thus, it is important that the laboratory maintains a close liaison with the cardiologist and that discordant values from the clinical picture are investigated by the use of HBT.

## G018

Rettondini M., Tombolato A., Marchetto S., Bonadonna G.

### FASE PREANALITICA 1: VALUTAZIONE DELL'INTERFERENZA DA EMOLISI, IPERTRIGLICERIDEMIA E IPERBILIRUBINEMIA IN CHIMICA CLINICA MEDIANTE L'UTILIZZO DEGLI INDICI DEL SIERO (SERUM INDEX)

U.O.A. Laboratorio Analisi, Azienda ULSS 20 Verona

L'interferenza da emolisi, ipertrigliceridemia e iperbilirubinemia nei campioni di chimica clinica ha sempre comportato difficoltà sia nella valutazione che nelle azioni correttive da mettere in atto. Nel nostro laboratorio abbiamo valutato per un gruppo di analiti (urea, glucosio, AST, ALT, ALP, CHE, GGT, LAD, CK, CKMB, bilirubina totale, Colesterolo, HDL, trigliceridi, acido urico, creatinina, proteine totali, calcio, fosforo, ferro, sodio, potassio, cloro, digossina) il grado di interferenza mediante la determinazione degli indici del siero (Serum Index) eseguiti automaticamente sulla nostra strumentazione (Hitachi).

I Serum Index, ottenuti per mezzo di letture, a lunghezze d'onda definite, delle assorbanze dei campioni, forniscono una valutazione più obiettiva dei livelli di emolisi, lipemia (torbidità) e ittero presenti.

A tale scopo è stato approntato un pool di plasmi in quantità adeguata e processato in triplo su tutti gli strumenti (2 Hitachi 917 – 2 Hitachi 912); per tutti gli analiti è stata calcolata la concentrazione media, la deviazione standard e l'imprecisione nella serie (CV%).

Il materiale interferente è stato approntato da un emolisato a concentrazione di emoglobina nota e da un campione ipertrigliceridemico ed iperbilirubinemico a concentrazione di trigliceridi e bilirubina note.

Abbiamo provveduto quindi ad aggiungere ad idonee quantità del pool di plasmi di origine quantità crescenti di emolisato, avendo cura di riprodurre nel miglior modo possibile da un punto di vista visivo i vari gradi di interferenza (lieve, moderata, forte, fortissima); analogamente i due campioni, torbido ed itterico, sono stati diluiti con un opportuno diluente per riprodurre visivamente gli stessi livelli di interferenza. Per conferma, i campioni così preparati sono stati fatti valutare in maniera random da parte di un gruppo di 24 tecnici: i risultati della valutazione hanno confermato le attese.

Le provette così preparate, oltre a quelle "gemelle" nelle quali al posto degli interferenti era stata aggiunta un'identica quantità di diluente per valutare il fattore della diluizione, sono state processate in prova duplicata per tutti gli analiti e su tutti i 4 strumenti Hitachi del settore di Chimica Clinica. Sono stati determinati media, deviazione standard, CV% (per tutti i differenti analiti) oltre ai Serum Index (S.I) per ogni livello di interferenza.

In questo modo sono stati stabiliti per ogni analita livelli di interferenza corrispondenti ai diversi intervalli di Serum Index.

## G019

Rettondini M., Bonadonna G., Trevisan M.T.

FASE PREANALITICA 2: LINEE GUIDA PER AZIONI CORRETTIVE NELLA GESTIONE DI CAMPIONI SOGGETTI AD INTERFERENZA DA EMOLISI – IPERTRIGLICERIDEMIA – IPERBILIRUBINEMIA TRAMITE L'UTILIZZO DEI SERUM INDEX: USO DI UN SISTEMA ESPERTO

U.O.A. Laboratorio Analisi, Azienda Ulss 20 Verona

Dopo aver determinato l'interferenza da emolisi, ipertrigliceridemia ed iperbilirubinemia per ciascuno dei principali analiti processati in Chimica Clinica (25) ed averla suddivisa in una scala a 4 livelli (lieve – moderata – forte – fortissima), abbiamo affrontato la problematica del superamento della valutazione visiva dell'interferenza, che può essere soggettiva e variabile, soprattutto in situazioni di emergenza o in presenza di personale non adeguatamente istruito.

Sono state perciò preparate 3 tabelle, nelle quali a ciascun livello di interferenza sono stati associati i corrispondenti intervalli di Serum Index. Nelle suddette tabelle, per ciascun analita (Urea, Glucosio, AST, ALT, ALP, CHE, LAD, CK, CKMB, GGT, AMY, Bilirubina, Colesterolo, HDL, Trigliceridi, Ac. Urico, Creatinina, Proteine totali, Calcio, fosforo, Ferro, Magnesio, Na, K, Cloro) e per ciascun intervallo di Serum Index, sono riportate le azioni correttive da mettere in atto.

Inoltre abbiamo utilizzato un sistema esperto presente sul LIS del Laboratorio per l'applicazione automatica di tali azioni.

Dopo aver sottoposto i campioni ad una selezione visiva secondo una scala cromatica opportuna, si procede alla determinazione dei Serum Index per la valutazione obiettiva: il sistema informatico traduce i valori secondo i criteri elencati nelle tabelle, applicando automaticamente le azioni correttive necessarie, che possono andare dall'apposizione di una nota di commento accanto al dato, alla soppressione di alcuni risultati, fino ad un giudizio di non idoneità completa del campione.

La procedura descritta appare particolarmente utile nel caso di Servizi di Emergenza ( Pronto Soccorso, Unità Coronarica, Terapia Intensiva), con la possibilità di effettuare in tempo reale una valutazione oggettiva di eventuali interferenze nella fase preanalitica e una applicazione automatica dei commenti opportuni.

## G020

Santori L., Rastelli M., Degli Antoni G., Mallozzi S., Vercesi S.

INTERFERENZE DA FARMACI DI USO COMUNE NEL DOSAGGIO IN HPLC DELLE CATECOLAMINE PLASMATICHE

Laboratorio Analisi Cliniche - Ospedale Civile - via Taverna, 49 29100 Piacenza

Scopo del lavoro è evidenziare interferenze da farmaci di uso comune nel dosaggio in HPLC delle catecolamine plasmatiche con rivelatore elettrochimico.

**Materiali.** Un volontario lievemente iperteso si è autosomministrato di volta in volta per tre giorni consecutivi i seguenti farmaci nelle dosi terapeutiche usuali: metildopa, propranololo, paracetamolo e fenilpropanolamina. Sono stati eseguiti un prelievo basale prima dell'inizio delle prove e per ciascun farmaco i prelievi al 1° e al 3° giorno, al tempo del picco di concentrazione ematica, secondo le informazioni tratte dalla letteratura.

**Metodi.** Dopo adsorbimento su allumina, purificazione ed eluzione con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, le catecolamine sono analizzate in cromatografia a scambio cationico con rivelatore elettrochimico.

**Risultati.** Rispetto al valore basale la concentrazione dell'adrenalina rimane invariata. La concentrazione della noradrenalina diminuisce (dal 41 al 66 %), anche nel caso degli ultimi due farmaci. Nei cromatogrammi dei campioni del 1° giorno non si rilevano picchi corrispondenti alle sostanze usate, invece al 3° giorno alcuni picchi addizionali rivelano la presenza di metaboliti.

**Conclusioni.** Nei cromatogrammi i farmaci usati non sono rilevabili nella forma originaria. Metaboliti di metildopa e di fenilpropanolamina sono chiaramente evidenziabili; con quest'ultima un grosso picco tardivo inquina il campione successivo.

## G021

Rampa P.<sup>1</sup>, Troisi E.<sup>2</sup>, Galizia P.<sup>2</sup>, Allori P.<sup>1</sup>, Bernardini S.<sup>1</sup>, Motti C.<sup>1</sup>, Cortese C.<sup>1</sup>, Federici G.<sup>1,3</sup>, Caltagirone C.<sup>2</sup>

### GENETIC MARKERS OF ATHEROSCLEROTIC RISK IN SUBJECTS AFFECTED BY STROKE

<sup>1</sup>Dip. Med. Int. Univ. "Tor Vergata" Roma; <sup>2</sup>IRCCS S. Lucia, Roma; <sup>3</sup>IRCCS "Bambino Gesù", Roma, Italy

Cerebrovascular disease is one of the most important causes of morbidity and mortality in the industrialized countries. There are many potential genetic factors that are supposed to play a causative role, alone or in combination with environmental variables. We studied a population sample of 154 well-characterized Italian patients with a clinical diagnosis of ischemic stroke, with a mean age of 69 years. Three gene polymorphisms known to be correlated with vascular risk were investigated in these subjects: the apolipoprotein E polymorphism (codons 112 and 158), the angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism, and the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) Ala/Val polymorphism. The following results were obtained:

- a) The apoE allele and genotype distributions in patients with stroke were not different from those reported for general population in Italy. In particular, we found an excess of apoE3 allele (85.3% of total) and low frequencies of the minor alleles (E2: 8.4%, E4: 6.3%). The E2 allele was associated with lower total cholesterol levels;
- b) The ACE D allele, presumed to be a risk factor for vascular disease, had a prevalence of 55.5% in patients with stroke, slightly lower with respect to frequencies found in healthy Italian population (about 60%);
- c) The prevalence of the Val/Val genotype of MTHFR polymorphism in patients with stroke was 18.5%, whereas in healthy Italian population it ranges from 15 to 25% according to literature. Furthermore, total plasma homocysteine levels measured in all our patients resulted more elevated than in normal population (mean 20  $\mu$ M), with higher values in subjects carrying at least one Val allele. This study was partly supported by a grant from Cofin '98- MURST and partly by a grant from MURST-CNR Biotechnology Program L.95/95.

## G022

Albertini R., De Luca G., Melzi D'Eril G.

### ASSAY OF WHOLE PLASMA AND LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RESISTANCE AGAINST OXIDATION BY LOW LEVEL CHEMILUMINESCENCE

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università dell'Insubria, Via Dunant 5, 21100 Varese; Laboratorio Analisi, Ospedale di Circolo, Viale Borri 27, 2110 Varese

It is generally accepted that oxidative modifications make human low density lipoprotein (LDL) more atherogenic than their native form. The methods currently used to assess resistance to oxidation of LDL include UV detection of conjugated dienes (CD, primary products of lipid peroxidation) and oxygen uptake measurement. In this study an alternative method to monitor oxidation of LDL (100  $\mu$ g/mL, protein) by monitoring low level chemiluminescence (LL-CL) is described. LL-CL was measured by a luminometer (Lucy 1, Labtech Instruments) in the range between 300 and 700 nm. LL-CL during lipid peroxidation resulted from recombination of two lipid peroxy radicals to a non-radical product, which yielded singlet oxygen and triplet carbonyl compounds. The LL-CL versus time profile of LDL oxidation induced by either  $\text{Cu}^{2+}$  (ranging from 0.5 to 2.5  $\mu$ mol/L) or a peroxy radical generator, AAPH (ranging from 0.5 to 2.5 mmol/L) exhibited an inhibited period (lag time) and a subsequent phase showing a considerable rise of light emission. Lag time is considered an important index of resistance to oxidation of isolated LDL in mechanistic and clinical studies and is commonly determined by CD assay. The correlation of lag time values obtained by LL-CL (x) and CD (y) assay was very high both in the case of  $\text{Cu}^{2+}$  and AAPH induced oxidation and was expressed by the following equations, respectively,  $y = 0,73x - 3,74$ ,  $r^2 = 0,98$ ,  $n = 5$  and  $y = 1,41x - 11,1$ ,  $r^2 = 0,99$ ,  $n = 5$ . We applied this technique to the monitoring of whole plasma oxidation. The most convenient experimental conditions to avoid the precipitation of plasma protein were the following: plasma was diluted 1:15 with physiologic saline and oxidation was induced by 1 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ , at 37 °C. The time course of plasma oxidation exhibited a lag time and a propagation phase, similarly to isolated LDL. The oxidation of whole plasma is likely to have a certain physiologic relevance, as lipoprotein oxidation is thought to take place in the subendothelial space of arterial wall, which is embedded by a fluid whose composition is similar to diluted plasma. As a conclusion, major advantage of LL-CL method are: a) the continuous and direct monitoring of LDL and plasma oxidation, b) the absence of analytical interferences typical of conventional lipid peroxidation assays.

R. Albertini and P.M. Abuja (1998) Free Radical Research, 29, 75-83.

## G023

Bagnati M.<sup>3</sup>, Cau C.<sup>3</sup>, Bordone R.<sup>3</sup>, Pergolini P.<sup>1</sup>, Brustia A.<sup>1</sup>, Prando M.<sup>2</sup>, Bellomo G.<sup>3</sup>

### LA CONCENTRAZIONE DEI CAROTENOIDI LICOPENE E $\beta$ -CAROTENE E' RIDOTTA NELLE SINDROMI CORONARICHE ACUTE

<sup>1</sup>Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche e <sup>2</sup>Divisione di Cardiologia, Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" e <sup>3</sup>Università del Piemonte Orientale, NOVARA

Una alterazione del bilancio stimoli proossidanti/difese antiossidanti può favorire lo sviluppo e la progressione della malattia aterosclerotica e può associarsi con la comparsa di una sindrome coronarica acuta (SCA). Uno studio preliminare è stato condotto su 77 pazienti non selezionati giunti alla osservazione del Pronto Soccorso per la comparsa di un dolore retrosternale, allo scopo di verificare se una significativa riduzione della concentrazione di uno o più antiossidanti liposolubili fosse una caratteristica tipica delle SCA. Fra i pazienti reclutati 15 avevano inequivocabili segni strumentali e biochimici di SCA ma, tuttavia, non differivano dall'altro gruppo di pazienti per età, sesso, abitudini di vita e quadro lipidico. Le indagini biochimiche condotte in tutti i pazienti reclutati comprendevano il dosaggio del colesterolo totale, HDL ed LDL, dei trigliceridi, dei marcatori di lesione miocardica (Mioglobina, CK-MB e Troponina-I), e della concentrazione plasmatica di  $\gamma$ -tocoferolo ( $\gamma$ -T),  $\alpha$ -tocoferolo ( $\alpha$ -T), licopene (Lic) e  $\beta$ -carotene ( $\beta$ -C). Il dosaggio di questi antiossidanti è stato effettuato con metodica HPLC dopo estrazione del plasma in esano.

Fra tutti gli antiossidanti dosati, solo la concentrazione plasmatica assoluta di Lic risultava significativamente ridotta nei pazienti con SCA rispetto ai pazienti di controllo ( $p < 0.036$ ). Tuttavia, una analisi più accurata evidenziava che, allorché le concentrazioni plasmatiche degli antiossidanti venivano normalizzate per contenuto di colesterolo, non solo il Lic ma anche il  $\beta$ -C risultavano significativamente ridotti nel gruppo dei pazienti con SCA rispetto ai pazienti senza SCA ( $0.116 \pm 0.051$  vs  $0.168 \pm 0.072$  per Lic,  $p < 0.02$ ;  $0.049 \pm 0.019$  vs  $0.067 \pm 0.042$  per  $\beta$ -C,  $p < 0.04$ ).

Questi risultati indicano che la concentrazione di alcuni antiossidanti liposolubili, ed in particolare dei carotenoidi licopene e  $\beta$ -carotene è significativamente ridotta in pazienti con SCA, e che, in queste condizioni, viene fornita una minore protezione antiossidante per unità di massa lipidica. Tuttavia, solo studi più estesi ed approfondito potranno evidenziare un chiaro ruolo patogenetico di questa riduzione delle difese antiossidanti.

## G024

Bagnati M., Gilodi R., Cau C., Perugini C., Bordone R., Bellomo G.

### L'ATTIVITÀ PEROSSIDASICA DELLE HDL RENDE RAGIONE DELLA LORO CAPACITÀ DI INIBIRE L'OSSIDAZIONE DELLE LDL

Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara

Gli idroperossidi lipidici svolgono un ruolo chiave nel mediare e nell'amplificare l'ossidazione delle lipoproteine mediata da metalli. La possibilità che una attività di riduzione dei perossidi lipidici associate alle HDL potesse rendere ragione della inibizione del processo di ossidazione delle LDL ad opera delle HDL è stata indagata in un gruppo di 24 soggetti giovani normocolesterolemici. A tutti i soggetti il sangue è stato prelevato dopo una notte di digiuno ed il siero ottenuto dopo centrifugazione. Il siero è stato successivamente impiegato per l'isolamento della frazione delle HDL e delle LDL. L'ossidazione delle HDL, delle LDL e della combinazione delle due lipoproteine è stata indotta, in vitro, da basse concentrazioni di  $\text{CuSO}_4$  e misurata spettrofotometricamente a 234 nm allo scopo di misurare in modo cinetico la formazione di dieni coniugati. L'attività di riduzione dei perossidi lipidici è stata valutata misurando, sullo stesso campione, la concentrazione sia del perossido che dell'idrossido del colesteril-linoleato. L'attività di riduzione dei perossidi risultava pressoché esclusivamente associata alle HDL, era in grado di ridurre solo i perossidi generati all'interno delle HDL e risultava statisticamente correlata alla capacità di inibizione della massima velocità di ossidazione delle LDL ( $p < 0.01$ ). Non è stata, al contrario, riscontrata alcuna correlazione fra la capacità di riduzione dei perossidi lipidici e la concentrazione dei principali antiossidanti liposolubili ( $\gamma$ -tocoferolo,  $\alpha$ -tocoferolo, licopene e  $\beta$ -carotene) o l'attività dell'enzima paraoxonasi. Al contrario, l'attività di riduzione dei perossidi lipidici è risultata statisticamente correlabile con le caratteristiche chimico-fisiche delle HDL stesse, ed in particolare con il rapporto proteina/colesterolo ( $p < 0.001$ ).

Questi risultati suggeriscono che le HDL possono esercitare il loro effetto protettivo nei confronti dell'ossidazione delle LDL riducendo i perossidi endogeni alla forma meno reattiva di idrossidi, riducendo, in tal modo, la disponibilità di specie in grado di alimentare continuamente il processo di perossidazione lipidica.

## G025

Bagnati M., Bordone R., Basile M., Cassani C., Porta P., Falischia M., Bellomo G.

### SUSCETTIBILITÀ ALL'OSSIDAZIONE DEI LIPIDI SERICI E POTERE ANTIOSSIDANTE

Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" e Università del Piemonte Orientale, NOVARA

L'ossidazione delle lipoproteine svolge un ruolo critico nel processo di aterogenesi e sicuramente controlla l'evoluzione della malattia aterosclerotica stessa. L'ossidabilità della componente lipidica delle lipoproteine è la risultante del bilancio fra stimoli proossidanti, da una parte, e difese antiossidanti, dall'altra. In questo studio è stata indagata la possibilità che la suscettibilità all'ossidazione delle lipoproteine potesse essere in qualche modo "predetta" dalla misurazione del potere antiossidante. Sono stati studiati 20 pazienti in cui era evidenziabile un marcato stress ossidativo (15 di essi erano in trattamento emodialitico per insufficienza renale e 5 erano affetti da sindromi coronariche acute). L'esistenza dello stress ossidativo era confermata da un significativo aumento dei prodotti di reazione radicalica (d-ROMS test, Diacron) in 15 pazienti, da una riduzione della concentrazione di gruppi -SH (SH-p test, Diacron) in 19 pazienti, a fronte di una apparentemente normale protezione dall'ossidazione (OXY-adsorbent test, Diacron). La suscettibilità all'ossidazione lipidica è stata valutata mediante chemiluminescenza spontanea su siero esposto a basse concentrazioni di  $\text{CuSO}_4$  o ad un generatore di perossil-radicali (AAPH). È stata quindi valutata la resistenza all'ossidazione (misurata come tempo necessario per il verificarsi di una ossidazione marcata, lag-phase). I due metodi di ossidazione hanno dato risultati differenti ( $126 \pm 54$  e  $309 \pm 51$  minuti rispettivamente) quantunque correlabili fra di loro ( $r=0.619$ ,  $p<0.004$ ). La durata della lag-phase e quindi la resistenza all'ossidazione non risultava correlabile né con la concentrazione dei principali antiossidanti liposolubili (misurati mediante HPLC), né con la disponibilità di gruppi SH, né con la concentrazione dei prodotti di reazioni radicaliche. Era invece possibile evidenziare una correlazione diretta altamente significativa fra la durata della lag-phase e la misurazione del potere antiossidante totale serico (PAO, MedDia) ( $r=0.802$ ,  $p<0.0001$  e  $r=0.825$ ,  $p<0.0001$  nel caso dell'ossidazione da rame e da AAPH rispettivamente).

Questi risultati, ancorché preliminari, suggeriscono come una valutazione accurata ed attendibile del potere antiossidanti possa rivelarsi un utile approccio chimico-clinico per la determinazione del rischio ossidativo delle lipoproteine.

## G026

Mastroianni A. (1); Bellati C. (2); Facchetti G. (1); Oldani S. (2); Franzini C. (3); Berrino F. (2)

### EFFECTS OF ADJUVANT TAMOXIFEN THERAPY ON PLASMA LIPIDS STATUS OF BREAST CANCER PATIENTS

(1) U.O. Medicina di Laboratorio 1, (2) Divisione di Epidemiologia, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, 20133 Milano. (3) Dipartimento di Scienze Biomediche, Ospedale "L. Sacco", Università degli Studi, 20129 Milano

We studied the effects of tamoxifen on plasma HDL cholesterol and other markers of the lipids status, in 115 breast cancer patients after mastectomy and underwent chemotherapy and/or radiotherapy. The patients were divided in two groups: receiving (45 out of 115 patients, T+) and no receiving tamoxifen (70 out of 115 patients, T-). A significant increase of HDL-cholesterol (59 mg/dl vs. 53 mg/dl,  $p < 0.01$ ) and of apo A-I (163 vs. 148 mg/dl,  $p < 0.001$ ) was observed in the T(+) compared to the T(-) group. HDL-cholesterol was significantly higher also in the T(-) group compared to the controls (53 mg/dl vs 48 mg/dl,  $p < 0.01$ ), while apo A-I was not. Other significant variations included decreased total- and LDL-cholesterol in the T(+) group compared to both the T(-) group and the controls. No significant variation was observed for the triglycerides level. In conclusion our data show that tamoxifen induces decrease of total- and LDL-cholesterol, and increase of HDL-cholesterol and apo A-I levels. It is suggested that this favourable change in plasma lipid profile could reduce the cardiovascular risk factors in breast cancer patients.

Posadino A.M.§, Carru C.\*, Pintus G.§‡, Debidda M.§, Barca M.\*, Galistu F.\*, Rossi R.\*, Pes G.M.\*, Tadolini B.§‡, Ventura C.§‡

DUE DIVERSE TECNICHE DI ESTRAZIONE DELLE LDL MODULANO DIFFERENTEMENTE LA CRESCITA DELLA CELLULA ENDOTELIALE IN COLTURA

§DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE, SEZIONE DI BIOCHIMICA, \*CATTEDRA DI BIOCHIMICA CLINICA, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI, ‡INBB, OSILO (SS), ITALIA.

E' noto che la modificazione ossidativa delle lipoproteine a bassa densità (LDL) rappresenta un evento chiave nella patogenesi dell'aterosclerosi. Nel presente lavoro abbiamo valutato l'effetto di LDL native (n-LDL) sulla funzionalità cellulare, usando due diverse metodiche per la loro estrazione. In particolare è stato analizzato l'effetto sulla sintesi del DNA in cellule endoteliali umane. Le LDL native sono state ottenute da plasma di soggetti normocolesterolemici e preparate seguendo due differenti protocolli. Per il primo tipo di n-LDL è stata utilizzata una rapida ultracentrifugazione seguita da una dialisi over-night (d-LDL), mentre il secondo tipo di n-LDL è stato ottenuto attraverso ultracentrifugazione seguita da filtrazione su gel (f-LDL). Lo stato ossidativo delle n-LDL isolate è stato quantificato utilizzando una nuova metodica spettrofotometrica da noi pubblicata di recente (1). La sintesi del DNA nelle HEC esposte alle due diverse n-LDL è stata misurata attraverso l'incorporazione di [<sup>3</sup>H] timidina in un terreno privo di siero. Questo dato è stato raffrontato a quello ottenuto dall'incorporazione di [<sup>3</sup>H] timidina da parte delle cellule trattate con il solo terreno di coltura. I risultati evidenziano che le cellule esposte a differenti concentrazioni di d-LDL (range 1-100 µg/ml di colesterolo) vanno incontro ad un aumento dose-dipendente della sintesi del DNA, mentre con concentrazioni di d-LDL superiori a 25 µg/ml è stata osservata la morte cellulare. D'altra parte, le cellule esposte a f-LDL, nelle condizioni sperimentali precedentemente illustrate, mostrano un aumento della sintesi di DNA superiore di due volte rispetto a quella ottenuta con le d-LDL. Questi risultati preliminari indicano che i due tipi di LDL sono in grado di modulare in maniera differente la risposta proliferativa cellulare. Infatti, le f-LDL avendo un minor grado di ossidazione rispetto alle d-LDL, sarebbero in grado di indurre un maggiore risposta proliferativa nelle colture cellulari da noi testate.

Deiana L., et al. *Free Radical Research* 1999 31: 237-244.

## G029

Abbate I., Correale M.(\*), Daniele A., Santamaria D., Quaranta M.

MATRIX METALLO-PROTEINASES (MMPS) AND TISSUE INHIBITOR OF METALLO-PROTEINASES (TIMPS) IN BREAST CANCER.

I.R.C.C.S. Oncologico-Bari, (\*) I.R.C.C.S De Bellis-Castellana Grotte(Ba).

Data from model system suggest that MMPs are involved in both stimulating cell growth and promoting invasion and metastasis. Tumor cells may either secrete those enzymes themselves or induce the host cells within the tumor stroma to produce them. TIMPs strongly inhibit the biological activity of MMPs and were shown to strongly inhibit cancer invasion, metastasis, growth and angiogenesis in some rodent and human tumours. Therefore, it is likely that an imbalance in the MMPs/TIMPs ratio plays an important role in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. MMP-2, one of MMPs, and the specific inhibitor TIMP-2 were immunolocalized in more than half of the cases of human breast carcinoma.

In the present study the relationship between the serum MMP-2/TIMP-2 ratio was examined in 121 patients affected of breast cancer. The mean $\pm$ 2s.d. of the serum MMP-2/TIMP-2 ratio in 65 healthy control subject was 12, whereas in cancer pts. the mean serum ratio was 23. According to TNM of breast cancer a significant difference was found only between T1 and T4 pts.( $p=0.04$ ) and N0 and N1 pts. ( $p=0.01$ ). All patients were observed for recurrence over a median period of 25 months (2-54). Eighty pts. were considered with no evidence of disease (NED) and 41 in progression of disease (PRO) and a significant difference ( $p=0.04$ ) of the serum MMP-2/TIMP-2 ratio was observed. In conclusion, our results indicate that the imbalance of serum MMP-2 and TIMP-2 (the MMP-2/TIMP-2 ratio) could be a new predictor of recurrence in breast cancer.

## G030

Metelli M.R.\*, Fulceri F., Puccetti C., Tararà M., Anselmi L., Giordani R.

APO-1/Fas SOLUBLE IN THE SERUM OF BREAST CANCER PATIENTS.

University of Pisa, Lab. of Specialistic Analysis, Pisa (Italy).

Fas (APO-1/CD 95) is a member of the TNF receptor superfamily. Soluble Fas can be produced by proteolysis of membrane-associated Fas. Ligation of Fas soluble by Fas can induce apoptotic cell death in cell expressing Fas and may provide a mechanism for tumor cells to escape immunoseirvellance. The aim of this study is to investigate the role of APO-1/Fas levels as a prognostic marker in breast cancer patients.

The sera of 41 breast cancer patients aged  $63\pm 9$  years ( $m\pm SD$ ),arroled in the order incoming to our ambulatory, were investigated. The disease's state was examined after the determination of APO-1/Fas in the serum. Blood was drawn in the morning, centrifuged and the sera stored at  $-80^{\circ}C$ . APO-1/Fas serum level was determined quantitatively by specific sandwich ELISA kit (Biosource International, Inc.). The APO-1/Fas serum value for 17 normal controls, aged  $45\pm 15$  years ( $m\pm SD$ ) was  $4.92\pm 0.96$  ng/ml ( $m\pm SD$ ); in the 29 breast cancer patients disease-free serum levels was  $4.81\pm 1.61$  ng/ml ( $m\pm SD$ ), in 12 patients with relapse was  $5.58\pm 0.89$  ng/ml ( $m\pm SD$ ). Serum concentration of APO-1/Fas, analized with test t Student for indipendent data, was significantly higher in patients with metastases than in patients without metastasis. These preliminary data suggest that serum levels of APO-1/Fas may useful in monitoring of breast cancer patients.

## G031

Meo S.<sup>1</sup>, Dittadi R.<sup>1</sup>, Fabris F.<sup>2</sup>, Gasparini G.<sup>3</sup>, Medici M.<sup>4</sup>, Gion M.<sup>1</sup>

PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO STANDARDIZZATO PER LA VALUTAZIONE DEL VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) CIRCOLANTE.

<sup>1</sup>Centro Regionale Indicatori Biochim. di Tumore, <sup>4</sup>Div. Oncologia Medica, Ospedale Civile, Venezia. <sup>2</sup>Clinica Medica II, Az. Ospedaliera Padova. <sup>3</sup>Div. Oncologia Medica, Az. Ospedaliera, Reggio Calabria.

Il VEGF svolge un importante ruolo nella regolazione dell'angiogenesi in condizioni fisiologiche e patologiche. In letteratura il VEGF è stato dosato nel siero di soggetti sani e/o con diversi tipi di tumore per valutarne il possibile utilizzo come marcatore di crescita e diffusione. Si è tuttavia dimostrato che nell'organismo il VEGF è presente anche nelle piastrine e nelle cellule nucleate del sangue. Nella preparazione del siero, durante la formazione del coagulo, le piastrine si attivano e liberano VEGF in quantità variabile rendendo il valore della proteina nel siero non attendibile. Abbiamo quindi misurato le concentrazioni di VEGF con un dosaggio ELISA (R&D Systems) in 10 soggetti sani e in 10 con carcinomi di diversa origine in stadio avanzato in differenti derivati del sangue: siero preparato a 37°C per 30' (attivazione massimale delle piastrine); plasma preparato con sodio citrato; plasma preparato con CTAD; sangue intero (lisato mediante diluizione 1:3 con acqua distillata sterile e due cicli di congelamento/scongelo). Plasma in miscela di Edimburgo (EDTA, PGE1, teofillina) è stato ultracentrifugato e raccolto evitando la parte vicina al menisco. L'attivazione piastrinica nei diversi derivati è stata monitorata mediante il dosaggio EIA del fattore piastrinico 4 (PF4, Roche Diagnostics).

I livelli più elevati di VEGF si sono riscontrati nel sangue intero (mediana 502 pg/ml, min-max 161-1221). Nel siero i livelli sono risultati più bassi (mediana 300 pg/ml, min-max 34-844). Nel plasma CTAD ed Edimburgo le concentrazioni sono risultate pressoché indosabili, tranne in un caso di carcinoma, dove probabilmente i livelli di VEGF proveniente dal tumore sono elevati (mediana 8 pg/ml, min-max 0-154). Tuttavia il plasma citrato mostra in alcuni casi livelli più alti che in quello preparato con gli altri. Il parallelo dosaggio del PF4 evidenzia nel sodio citrato livelli significativi di PF4. L'uso del sodio citrato potrebbe quindi esporre al rischio di misurare livelli falsamente elevati di VEGF circolante.

Si propone quindi un protocollo per la valutazione del VEGF circolante nell'ambito di studi clinici, che prevede la raccolta di siero dopo incubazione a 37°C per 30 min, di plasma in CTAD e di sangue intero.

## G032

Frigerio S., Eoli M., Gelati M., Silvani A., Boiardi A., Salmaggi A., Bernardi G.

LIVELLI LIQUORALI DI MMP-9 IN PAZIENTI CON LINFOMA NON-HODGKIN DEL SNC, MEDULLOBLASTOMA E TUMORI GERMINALI.

Istituto Nazionale Neurologico C.Besta, via Celoria 11, 20133 Milano.

Tra i tumori primitivi del SNC, alcuni istotipi possiedono la peculiarità di disseminare per via liquorale con frequenza variabile. Tale caratteristica è verosimilmente correlata alla capacità delle cellule neoplastiche di secernere enzimi ad attività litica sulle proteine della matrice extracellulare: MMP-9 ed MMP-2 sono state rilevate nel liquor di pazienti con tumori gliali primitivi e con metastasi cerebrali, indipendentemente dalla presenza di cellule neoplastiche all'esame citologico liquorale. Non vi sono dati in letteratura sui livelli di metalloproteasi nei medulloblastomi/PNET e nei tumori germinali, neoplasie con elevata capacità di disseminare per via liquorale.

Abbiamo quantificato i livelli di MMP-9 serici e liquorali mediante ELISA (Quantikine R&D Systems) in 10 pazienti con malattie neurologiche non infiammatorie, in 12 pazienti con medulloblastoma/PNET, in 6 pazienti con tumori germinali e in 10 pazienti con linfomi primitivi del sistema nervoso centrale. Nel liquor sono stati riscontrati livelli dosabili di MMP-9 in 6/12 pazienti con medulloblastoma/PNET, in 1/6 con tumori germinali e in 2/10 con linfoma primitivo del SNC. Dei 9 pazienti con livelli di MMP-9 liquorali dosabili, nessuno presentava positività per cellule neoplastiche all'esame del citocentrifugato liquorale; d'altro canto, i 2 pazienti in cui l'esame citologico liquorale risultava positivo per cellule neoplastiche (1 con germinoma e 1 con medulloblastoma) presentavano livelli liquorali di MMP-9 non dosabili.

I dati vengono discussi anche alla luce del quadro neuroradiologico (RMN encefalo e midollo) e all'andamento clinico dei pazienti indagati.

## G033

Antonini G., Ciardi L., Tomassini G., Ferraro S., Bellomo G.

### RUOLO, SPECIFICITÀ E SENSIBILITÀ DI BTA STAT, BTA TRAK, NMP22, UBC NELLA DIAGNOSI DEL TUMORE DELLA VESCICA

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità - Novara

Il tumore della vescica rappresenta la quinta tra le forme più comuni di tumore nei pazienti di sesso maschile e l'undicesima tra quelli di sesso femminile. Nel 75-85% circa dei pazienti si tratta di un carcinoma a cellule di transizione (TCC) limitato alla mucosa superficiale della vescica. Questo studio si è proposto di valutare l'utilità del dosaggio dei markers urinari BTA stat, BTA trak, NMP22 ed UBC in pazienti affetti da carcinoma della vescica all'atto della diagnosi di tumore primitivo o recidiva. E' stata inoltre verificata la correlazione tra i marcatori considerati, lo stadio ed il grading del tumore, al fine di evidenziare il marcatore potenzialmente più affidabile ai fini diagnostici. Lo studio è stato effettuato su 64 pazienti affetti da carcinoma della vescica (19 all'atto della diagnosi e 45 già sottoposti a precedenti resezioni transuretrali) e 14 pazienti senza segni di malattia in corso o con patologie benigne. Su tutti i pazienti è stato eseguito il dosaggio urinario dei marcatori: BTA stat, BTA trak, NMP22. In 51 pazienti è stato effettuato anche il dosaggio di UBC.

I campioni di urine sono stati raccolti prima di qualsiasi indagine strumentale sull'apparato urogenitale. I valori soglia ottenuti in 40 pazienti presumibilmente sani sono stati: 14 U/ml per BTA trak, 10 U/ml per NMP22 e 12 µg/L per UBC. Nei 64 pazienti con carcinoma della vescica BTA stat ha dimostrato una sensibilità del 72.5%, BTA trak del 64%, NMP22 del 56.2 % e UBC del 43.1 %. La specificità è stata del 100% per BTA stat, del 92.9 % per BTA trak, del 100% per NMP22 e del 70% per UBC; l'accuratezza dei vari test è stata rispettivamente del 77.8%, 69.2 %, 64.1% e 47.5%. L'analisi ROC ha evidenziato un'area sottesa alla curva e quindi un'accuratezza uguale per BTA trak e NMP22.

In rapporto allo stadio della malattia neoplastica, sono emerse differenze significative tra gli stadi Ta e T1 per BTA stat, BTA trak ed NMP22 e, limitatamente a BTA stat e a NMP22, anche tra gli stadi Ta e T2, con un aumento dei valori dei markers associato alla progressione dello stadio neoplastico. Dalla stessa correlazione applicata al grading è stata riscontrata una differenza significativa tra il grado 1 e il grado 2 per BTA stat e NMP22 e tra il grado 1 ed il grado 3 per tutti i marcatori considerati, con un aumento dei livelli con il progredire del grading istologico. Fra i pazienti esaminati all'atto della diagnosi primitiva e quelli esaminati a seguito di recidiva, sono state riscontrate differenze statisticamente significative per BTA stat e per NMP22. La capacità discriminante di BTA stat ed NMP22 nei confronti del tipo di diagnosi è stata altresì confermata in un modello statistico complesso in cui erano presenti tutti e quattro i marcatori.

## G034

Bettinardi N., Colombo C.<sup>^</sup>, Felicetta I.\*<sup>\*</sup>, Padoan R.<sup>^</sup>, Rossi G.\*<sup>\*</sup>, Comi S.<sup>^</sup>, Biagini G.\*<sup>\*</sup>

### CARBOHYDRATE 19-9 (CA 19-9) IN LIVER DISEASE ASSOCIATED WITH CYSTIC FIBROSIS.

Analysis Laboratory, Sesto San Giovanni Hospital, Sesto San Giovanni, Milan; \*Clinical Research Laboratory, ICP, Milan; <sup>^</sup>CF Center and Depts of Pediatrics, University of Milan and Sassari, Italy

A test for evaluation of biliary cell damage and dysfunction would be desirable for early detection of cystic fibrosis (CF) associated liver disease (LD); this latter is recognized as a major cause of morbidity in CF. The lack of CF transmembrane regulator in the apical membrane of bile duct cells, documented in CF, may lead to abnormalities in biliary drainage, with chronic cholestasis. CA 19-9 is a tumor marker used for the diagnosis of gastrointestinal malignancies including cholangiocarcinoma, and a raise in its serum concentration has been documented also in various benign LD, mainly due to increased production by biliary epithelial cells.

We studied 87 CF patients (53 males, 13.5±5.3 yrs) and 31 healthy controls (16 males, 13.6±6.5 yrs); 36 CF patients had LD (25 males, 14.1±5.0 yrs) defined by at least two of the following: hepatomegaly, abnormal liver biochemistry, abnormal ultrasonography; 51 CF patients had not LD (28 males, 13.1±5.6 yrs). CF patients with hepatitis C were excluded from the study. In all subjects serum concentrations of CA 19-9 (immunometric method, DCP-Medical Systems), standard liver function test (hepatic ALP, ALP, total bilirubin, AST, ALT, γGT), bile acids (RIA) and amylase were determined. Data were analyzed by unpaired t test for nonhomogeneity variances.

Compared to controls (12.3±10.8 U/mL), serum CA 19-9 concentrations were significantly higher in both CF patients with LD (86±61 U/mL; p<0.0001) and without LD (53±74 U/mL; p=0.0003). However, discrimination between patients with and without LD was far than satisfactory and values above the cut off of 22 U/mL were found in 83% of patients with LD but also in 45% of those without LD.

CA 19-9 serum concentrations are frequently increased in CF patients and are probably a poorly specific marker of LD. Data suggest that CA 19-9 has limited usefulness in detecting early LD associated CF, unless to establish a specific cut off; we don't exclude the possible usefulness of CA 19-9 in the follow-up of CF patients.

*References: Bettinardi N, Colombo C, Felicetta I, Comi S, Capasso P.*

*CA 19-9 in liver disease associated with cystic fibrosis. LYGAND ASSAY 1999;4:421*