

Dubini A., Cristiani P.

MARCATORI OSSEI: VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO IN ELETTROCHEMILUMINESCENZA SULL'ELECSYS 2010.

Istituto Auxologico Italiano, Ospedale San Luca IRCCS, Milano

Scopo di questo lavoro è stato confrontare il dosaggio dei parametri che riguardano i marcatori ossei di formazione e riassorbimento: osteocalcina (BGP), paratormone (PTH), ed il nuovo marker plasmatico β -CrossLaps (Telopeptide C-terminale - CTx) eseguito con lo strumento automatico in elettrochemi-luminescenza (ECL) Elecsys 2010 (Roche, Svizzera) con i metodi attualmente in uso presso il nostro laboratorio. La tecnologia ECL utilizza un complesso di Rutenio (II) tris(2,2' bipyridile) come marcatore che, in presenza di tripropilamina produce una reazione luminescente indotta dall'applicazione di una differenza di potenziale elettrico*. I metodi di confronto sono stati i seguenti: per la BGP è stato utilizzato un dosaggio radioimmunologico (RIA) prodotto dalla Technogenetics, Italia; per il PTH è stato utilizzato un metodo immunoradiometrico (IRMA) prodotto dalla DiaSorin, Italia. La validità diagnostica del CTx è stata valutata utilizzando come confronto l'NTx urinario (dosato con metodo EIA), la fosfatasi alcalina e BGP. La valutazione statistica dei risultati è stata effettuata mediante analisi della regressione lineare.

Risultati:

analita	metodo confronto	coef.corr.	equaz. retta	n.
BGP	RIA	0.98	$y=1.31+3.11x$	71
PTH	IRMA	0.90	$y=17.07+0.73x$	79
CTx	NTx ur	0.66	$y=-56.0+356x$	71
CTx	FA	0.62	$y=134.5+180x$	71
CTx	BGP	0.79	$y=0.45+20.7x$	71

In conclusione i risultati ottenuti indicano, per quanto riguarda il PTH una buona correlazione dei dati ottenuti con ECL e metodo di riferimento. Per l'osteocalcina, pur a fronte di un'ottima correlazione tra i metodi, i valori ottenuti con l'ECL appaiono nettamente sovrastimati dal momento che in questo caso vengono dosati anche i frammenti della molecola. Infine, il CTx risulta correlabile a BGP e FA oltre che all'analogo peptide NTx urinario configurandosi quindi come un indice valido nello studio dei fenomeni di riassorbimento osseo.

*Blackburn G.F. et al. *Elettrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probes assays for clinical diagnostics. Clin. Chem. 1991; 37:1534-1539.*

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

SERUM LEPTIN LEVELS IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AND HYPOTALAMIC AMENORRHEA.

°3 Laboratory Analysis, Spedali Civili-Brescia, Italy

*Department of Gynaecological Endocrinology, University of Brescia, Italy

Leptin, a 16 KDa protein secreted from white adipocytes, is involved in the regulation of food intake and energy expenditure. The encoding leptin gene *ob* has been identified through positional cloning techniques.

This hormone circulates in serum specifically bound to protein which may regulate its half-life and biological activity.

Isoforms of the leptin receptor are found not only in the hypothalamus, but in multiple tissues including ovary. Most human obesity is characterized by hyperleptinemia, with close relationship between BMI (Body Mass Index) and circulating leptin.

Several recent observations suggest that high leptin levels can contribute to infertility in some women with PCOS (Polycystic Ovary Syndrome) and, thus, that leptin may generally play a role in the regulation of the reproductive axis.

We performed this study to investigate changes in leptin levels in obese and nonobese patients selected for PCOS and HA (Hypothalamic Amenorrhea) when compared to age and weight matched normal control. Control women were healthy, less than 35 years of age with regular ovulatory menstrual cycles. Serum leptin levels were measured by human leptin RIA kit (DRG Diagnostics GmbH, Germany) which employs rabbit anti-leptin polyclonal antibodies. This antiserum was raised against highly purified human leptin. The standards are prepared using purified recombinant human leptin. The results are showed in the Tables.

TABLE I	BMI (Kg/m ²)	Leptin (ng/mL)
PCOS obese n = 10	$32.2 \pm 5.33^*$	$30 \pm 13^{**}$
PCOS nonobese n = 16	19.9 ± 2.54	$8.31 \pm 3.77^{\circ \circ}$
Controls n = 15	20.9 ± 1.53	11.1 ± 3.43

*p < 0.001 (vs controls)

**p < 0.005 (vs controls)

° p < 0.05 (vs controls)

°° p < 0.001 (vs PCOS obese)

TABLE II	BMI (Kg/m ²)	Leptin (ng/mL)
HA obese n = 6	$28 \pm 0.81^*$	$22.3 \pm 2.63^*$
HA non obese n = 28	$20 \pm 2.53^{\circ}$	$7.31 \pm 3.83^{** \circ}$
Controls n = 15	20.9 ± 1.53	11.1 ± 3.43

*p < 0.001 (vs controls)

**p < 0.005 (vs controls)

°p < 0.001 (vs HA obese)

Our results confirm that high leptin levels may contribute to infertility in some women with PCOS.

In HA non obese women leptin levels were significantly lower than controls. This could suggest that in chronic conditions leptin regulation is not entirely dependent from body fat stores.

Clinic Bioch. vol 32 Feb. 1999

Jour. Clin. End. Met. vol 83 N.1 1998

M079

Sander P.H., Hanitsch S., Schlett R., Mack M.

LIAISON® C-PEPTIDE: DEVELOPMENT OF A CHEMILUMINESCENT C-PEPTIDE ASSAY FOR THE USE ON THE FULLY AUTOMATED LIAISON® RANDOM ACCESS ANALYSER

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

The measurement of C-peptide originally rendered a suitable alternative to monitor B-cell secretory activity in diabetic patients with high prevalence of anti-insulin antibodies. Additionally, the determination of C-peptide concentrations provides an estimate of the endogenous insulin secretion in the presence of exogenous insulin. One of the most common applications of C-peptide assays however is the monitoring of residual B-cell secretory capacity in type 1 diabetes patients during the process of immune destruction of B-cells. We describe a C-peptide assay for use on the LIAISON® analyser. C-peptide is measured with a one-step anti-C-Peptide sandwich immunoassay using two monoclonal antibodies. The 50 µl sample is incubated with coated magnetic particles and isoluminol labelled tracer antibodies 10 minutes prior to the washing steps. Chemiluminescence is measured after subsequently adding two starter reagents to the immunocomplex. Sample concentrations are calculated using a stored master curve calibrated to the international reference material IRR C-peptide, 84/510. First results can be obtained in approx. 15 min. The assay ranges from 0-30 ng/ml. Analytical sensitivity is <0.05 ng/ml (2SD). Within-assay precision: <8% between 0-5.0 ng/ml and <6% for concentrations between 5.0 and 30.0 ng/ml. Inter-assay precision values: <8% between 0-5.0 ng/ml, <5% for concentrations between 5.0 and 30 ng/ml. Samples run on the LIAISON C-peptide assay show good linearity upon dilution: +/- 10% of the theoretical sample value. No HDH effect was found up to 200 ng/ml. No cross-reactivity with human insulin could be detected. Cross-reactivity in serum samples with artificially increased proinsulin concentration (500 ng proinsulin /ml) could be detected. Fasting concentrations of proinsulin however are typically only 1-2% of C-peptide concentration and therefore, the cross-reactivity is of no clinical significance. Correlation experiments with commercial C-peptide assays are in progress. In conclusion, LIAISON C-Peptide is a rapid and reliable assay for the automated determination of serum C-Peptide.

M080

Markowitz G., Engel B., Schlett R., Mack M.

LIAISON® LH – A NEW AUTOMATED CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF LUTEINISING HORMONE (LUTROPIN) IN HUMAN SERUM

Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Germany

Luteinising hormone (lutropin, LH) is a 30 kDa glycoprotein which exists in a variety of isoforms. For the determination of LH the new LIAISON® LH immunoassay has been developed for the fully automated, random access LIAISON immunoassay analyser. The LIAISON LH immunoassay completes the reproduction proteohormone panel for the LIAISON assay system. The LIAISON LH assay is a two-site immunoluminometric one-step assay using two monoclonal antibodies highly specific for different epitopes on the lutropin antigen. A specially designed unique Reagent Integral contains all specific reagents sufficient for the determination of 100 samples. Cooling of the reagent compartment guarantees an on-board stability of at least 2 weeks. The data reduction is performed after a 2-point recalibration of a stored master curve. The assay protocol uses 50 µl of sample, 200 µl of tracer and 20 µl of antibody-coated magnetic particles. After 10 min incubation the particles are separated, washed and the chemiluminescent signal is generated by the addition of two ready-to-use trigger reagents. The time to first result is only 15 min. The assay with an extended standard range up to 250 mIU/ml shows no high-dose hook effect up to 30,000 mIU/ml. Precision data (typical within-run %cvd <3%; between-run %cvd <6%), linearity upon dilution, recovery (±10% of the theoretical sample value), and sensitivity (typically 0.1 mIU/l for 2s-intercept) are excellent. The assay neither cross-reacts with TSH, FSH, Prolactin, HCG, HGH and HPL, nor does it interfere with bilirubin, triglycerides and haemoglobin. Interference by HAMA is successfully prevented by the addition of a blocking agent. The assay shows a very good correlation to Elecsys and Abbott AxSYM ($r > 0.98$) and the in-house methods LIA-mat®/IRMA-mat® LH ($r = 0.97$). In summary, the LIAISON LH assay offers a rapid, reliable and fast method for the fully automated determination of lutropin in human serum.

M081

Patrosso C.¹, Mosca A.², Bonora R.³, Ceriotti F.⁴, Franzini C.⁵, Lando G.¹, Marocchi A.¹, Paleari R.², Zaninotto M.⁶, Panteghini M.³

GENETIC DEFECTS OF SERUM CHOLINESTERASE: A CORRELATION BETWEEN ENZYMIC ACTIVITY, DIBUCAINE AND FLUORIDE NUMBERS, AND GENOTYPE

¹Osp. Niguarda Ca' Granda, Milano; ²Universita' di Milano; ³Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia; ⁴Osp. San Raffaele, Milano; ⁵Osp. 'Luigi Sacco', Milano; ⁶Azienda Ospedaliera, Padova, Italy

Several genetic variants of human serum cholinesterase (CHE) have been described mainly at phenotype level by the measurement of the enzymatic activity with and without the presence of specific CHE inhibitors. Some of them, i.e. the 'atypical' and the 'fluoride resistant', are well known because carriers are prone to develop prolonged apnoea after the administration of the muscle relaxant succinylcholine. However, the accurate recognition of such variants is becoming more difficult due to the following reasons: 1. the number of the known enzyme mutants is growing rapidly; 2. different methods are available to evaluate CHE activity; 3. recommendations for the measurement of catalytic concentrations of CHE are lacking. The SIBioC Committee on Enzymes carried out a multicenter study dedicated to the standardization of the CHE measurement and to investigate the relationship between the type of mutation and total CHE activity. Six methods to measure CHE activity at 37°C [benzoylcholine / choline oxidase - peroxidase, butyrylthiocholine / DTNB, butyrylthiocholine / hexacyanoferrate(III), p-OH-benzoylcholine / NADP hydroxylase, propionylthiocholine / DTNB, and succinylthiocholine / DTNB] were implemented on automatic analyzers and compared in their capacity to separate CHE genetic variants. 70 serum samples from healthy blood donors with normal to low CHE activities were screened for dibucaine (DN) and fluoride (FN) numbers by the method of Kalow and Genest. Among them, 48 samples (25 with normal and 23 with low CHE activity) were also genotyped. Out of the 70 selected samples, 17 subjects with E^uE^a, 2 with E^aE^a, 3 with E^aE^f and one with E^uE^f presumed genotypes were identified using DN and FN. On these samples, 24 known CHE mutations were analyzed by RG-PCR. All the subjects presented at least two mutations in the CHE coding region. 12 homozygotes for the K variant ('Asp539Thr'), 2 for the 'atypical' ('Asp70Gly') and one for the 'Glu271Stop' were found. All the other samples were compound heterozygotes for the above mentioned variants and/or for 'Gly390Val' and 'Thr243Met' (one subject). In the group of the 19 carriers of the 'atypical' mutation, the best correlation among CHE activity and DN was found when CHE was measured by the succinylthiocholine method, confirming that the measurement based on the ability to hydrolyze succinylthiocholine is superior respect to the other tested methods in detecting 'atypical' enzyme.

M082

Pagani F., Panteghini M.

BIOLOGICAL VARIATION IN SERUM ACTIVITIES OF THREE HEPATIC ECTOENZYMES

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

Changes in serum activity of γ -glutamyltransferase (GGT), 5'-nucleotidase (NTD), and liver form of alkaline phosphatase (LAP) are typically associated with pathological processes of the liver. However, relatively few data have been published on the biological variability of these three hepatic ectoenzymes in serum. Using a robust and well-defined protocol, we report here a definitive assessment of biological variation of these three enzymes. Analytical (CV_A), within-subject (CV_I), and between-subject (CV_G) components of variation were determined for GGT, NTD, and LAP in serum from 10 apparently healthy subjects (5 men and 5 women, ages 25-50 years) by taking 4 blood specimens from each of them on the same day once a week for 4 weeks. From these data, we also calculated the index of individuality (II), the critical differences (CD) for significant change in serial results ($P \leq 0.05$), and the number of specimens (n) required to estimate, within $\pm 10\%$, the homeostatic setpoint of an individual. GGT was determined using the IFCC method. NTD was determined by the BioMerieux Enzyline® method. The activity of LAP was determined with an electrophoretic procedure by adding neuraminidase to the sample 15 min before electrophoresis. Tracings were scanned by densitometry and LAP calculated by the product of the total AP activity (measured by IFCC method) and the percentage of the stain appearing in the LAP region. GGT, NTD, and total AP were measured at 37°C on a Dade Behring Mega® analyzer. The following table shows the results obtained:

		CV _A , %	CV _I , %	CV _G , %	II	CD, %	n
GGT	All	2.4	7.3	47.3	0.2	21	2
	Men		6.4	29.4	0.2	19	2
	Wom		8.8	32.8	0.3	25	3
NTD	All	7.3	4.1	10.5	0.4	23	3
	Men		0	16.4	-	20	2
	Wom		5.7	3.7	1.5	26	3
LAP	All	4.0	10.4	27.2	0.4	31	5
	Men		11.9	35.0	0.3	35	6
	Wom		8.9	21.7	0.4	27	4

For GGT and LAP most of the observed variability was biologic, whereas NTD had also high analytical variability. NTD was the parameter showing the lowest CV_I (even 0 in men) and the lowest CV_G. All the three enzymes had marked individuality (II < 0.6), showing that the use of population-based reference limits is inadequate for their interpretation.

M083

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

IMPLEMENTAZIONE DI 5 DETERMINAZIONI ENZIMATICHE ED ISOENZIMATICHE SU ANALIZZATORE ABBOTT AEROSSET

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

Scopo di questo lavoro è stato quello di implementare su una strumentazione completamente automatica recentemente commercializzata, l'analizzatore Abbott Aeroset™, i metodi per la determinazione di alcune particolari attività enzimatiche ed isoenzimatiche: glutammato deidrogenasi (GLD, reattivo "home made" sec. DGKC), isoenzima mitocondriale dell'aspartato aminotransferasi (mAST, metodo proteinasi K), 5'-nucleotidasi (NTD, metodo Enzyline® BioMerieux), amilasi pancreatica (pAMY, metodo Roche Diagnostics) e lipasi (LPS, metodo Bayer). Per confronto, tali metodi sono stati eseguiti utilizzando un analizzatore Roche Cobas Bio, impiegato nella routine del Laboratorio. Nella valutazione dei metodi sono state seguite le indicazioni contenute nei documenti del NCCLS americano, relative alla valutazione della imprecisione (EP5-A) e alla comparazione fra metodi (EP9-A). In particolare, lo studio dell'imprecisione strumentale è stato effettuato analizzando in doppio, per 10 sedute analitiche, due pool di sieri umani di attività pari al 75° percentile della distribuzione dei valori di riferimento e a circa 3-5 volte il limite superiore di riferimento del corrispondente enzima, ed il confronto fra metodi su 40 campioni di siero umano a varia attività. L'accettabilità dell'imprecisione si è basata su criteri biologici (CB: ≤0.5 variabilità intraindividuale), quando disponibili, e/o storici (stato dell'arte del laboratorio: IQC) (vedi tabella seguente):

Enzima	Media	CV _{totale}	CB	IQC
GLD	4 U/L	7.7%	-	9.4%
	32 U/L	1.8%	-	-
mAST	1.9 U/L	20.2%	-	8.3%
	9.3 U/L	5.8%	-	3.2%
NTD	8 U/L	6.6%	11.6%	5.2%
	23 U/L	3.8%	11.6%	-
pAMY	26 U/L	2.8%	5.9%	2.4%
	250 U/L	0.8%	5.9%	-
LPS	21 U/L	4.0%	11.6%	4.5%
	371 U/L	0.9%	11.6%	-

La comparazione dei risultati del metodo Aeroset (y) con quelli ottenuti con il metodo di confronto (x) ha fornito le seguenti correlazioni:

- per GLD, $y = 0.91x + 0.1$, $r = 0.9928$, $Syx = 1.62$;
- per mAST, $y = 0.94x - 0.3$, $r = 0.9973$, $Syx = 0.73$;
- per NTD, $y = 1.00x - 0.3$, $r = 0.9953$, $Syx = 1.41$;
- per pAMY, $y = 0.98x + 1.7$, $r = 0.9997$, $Syx = 2.63$;
- per LPS, $y = 0.98x + 0.2$, $r = 0.9989$, $Syx = 3.61$.

Tutti i metodi considerati erano quindi adattabili allo strumento Aeroset, con risultati sostanzialmente sovrapponibili a quelli precedentemente ottenuti.

M084

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

FORME ISOENZIMATICHE DELLA N-ACETIL-β-D-GLUCOSAMINIDASI DELLA MEMBRANA DEL GLOBULO ROSSO UMANO.

^aDip. Chim. Biochim. Med., Università degli Studi di Milano. ^bServizio Trasfusionale dell'Ist. Nazionale dei Tumori, Milano.

Di recente sono stati approfonditi gli studi sulle glicoidrolasi di membrana del globulo rosso umano, delle quali sono state definite le condizioni ottimali di dosaggio e le modalità di ancoraggio alla membrana eritrocitaria (1). Non è tuttavia ancora noto il ruolo che questi enzimi hanno sulla membrana e poco si sa sulla presenza di eventuali forme isoenzimatiche.

Con la presente ricerca abbiamo studiato il pattern isoenzimatico della N-acetil-β-D-glucosaminidasi (NAG), che, fra tutte le glicoidrolasi, è stata da sempre la più studiata nei materiali biologici e i cui livelli sono risultati alterati in alcune specifiche situazioni patologiche e fisiologiche. I globuli rossi e i relativi ghosts sono stati preparati secondo il metodo di Steck et al.. La separazione degli isoenzimi della NAG è stata effettuata con una cromatografia focalizzata su PBE-94 utilizzando come tampone di equilibratura l'imidazolo-HCl 25mM a pH 7.4 e come tampone di eluizione il polybuffer 74-HCl a pH 4.0 diluito 1/10, tutte le soluzioni erano allestite con Triton X100 alla concentrazione finale dello 0.3%. L'attività della NAG è stata determinata con metodo fluorimetrico utilizzando il 4-MU derivato come substrato e il 4-MU6S come substrato specifico per il dosaggio della sola subunità alfa.

Con questa metodologia è stato possibile identificare la presenza di tre gruppi di forme isoenzimatiche: un primo gruppo, il meno acido e formato da 4 isoforme, con punti isoelettrici varianti da 6.0 a 5.2.; un secondo gruppo, più acido e formato da 3 isoforme, con punti isoelettrici varianti da 4.6 a 4.1 ed un ultimo gruppo tenacemente legato alla PBE-94, il più acido e formato da due isoforme, che si viene ad eluire utilizzando come eluente l'NaCl 1M. L'utilizzo del substrato 4-MU6S ha messo in evidenza che il secondo e il terzo gruppo di forme isoenzimatiche contengono la subunità alfa. Il pattern isoenzimatico così ottenuto per la NAG della membrana eritrocitaria è stato quindi paragonato con quello parallelamente verificato in plasma, linfociti e piastrine: il primo gruppo di isoenzimi sono stati quindi rapportati alla forma "B", il secondo alla forma "A" ed il terzo alla forma "C", già note in questi materiali biologici. Nessuna variazione del profilo isoenzimatico della NAG è stato rilevato quando si sono trattati i ghosts con sialidasi per cui queste forme sotto questo aspetto sono più simili a quelle lisosomiali piuttosto che a quelle plasmatiche.

(1) G, Goi et al. "Membrane anchoring and surface distribution of glycohydrolases of human erythrocyte membranes" FEBS 473/1, pp. 89-94 (2000).

M085

G. Cattozzo¹, C. Franzini², P. Pettini¹, G. Melzi d'Eril^{1,3}

MISURA DELLA LIPASI CON METODI CHE UTILIZZANO IL MEDESIMO SUBSTRATO: NON-COMMUTABILITÀ DEI MATERIALI DI RIFERIMENTO CON I SIERI DA PAZIENTI

¹A. O. Fondazione Macchi, Varese; ²Università di Milano, Milano; ³Università dell'Insubria, Varese

Nel processo di standardizzazione, il comportamento intermetodi dei materiali di riferimento (MR) non deve differire da quello dei sieri da pazienti (SP), cioè i MR devono essere commutabili. La non-commutabilità dei MR è causata dall'interazione tra le caratteristiche chimico-fisiche dei MR e la robustezza dei metodi; pertanto, nella messa a punto di un metodo analitico è utile valutare la frequenza con cui tale metodo può dare luogo a fenomeni di non-commutabilità. In questo lavoro si è valutata la commutabilità di alcuni MR del commercio tra metodi per la misura della lipasi (EC 3.1.1.3) basati sull'utilizzo del substrato 1,2-O-dilauril-rac-glicerico-3-glutaril-(6-metilresorufin) estere: per il metodo di confronto venivano utilizzati reagenti (R) del commercio (Roche, Milano), mentre i metodi confrontati impiegavano, a turno, reagenti in 4 preparazioni sperimentali (Sentinel, Milano). Due di questi reagenti contenevano stabilizzanti proteici (0.3 g/L): uno di questi (P250) conteneva micelle di substrato con diametro di 250 nm, l'altro (P400) conteneva micelle di 400 nm. Gli altri due reagenti non contenevano stabilizzanti proteici: uno di essi (NP250) conteneva micelle di 250 nm, l'altro (NP400) conteneva micelle di 400 nm. Venivano analizzati 101 SP e 29 MR, con i 5 metodi a 37°C su analizzatore Hitachi 912. Per valutare la commutabilità dei MR, i risultati forniti da P250, da P400, da NP250 e da NP400 (asse y), a turno, venivano confrontati con i risultati forniti da R (asse x) e si valutava la dispersione dei SP attorno alla retta di regressione (non-parametrica) calcolando la deviazione standard dei residui ($S_{y/x}$); i MR che presentavano uno scostamento dalla retta di regressione dei SP superiore a 3 $S_{y/x}$ venivano considerati non-commutabili. L'analisi della regressione dava $y = 0.35x + 14.7$ U/L ($S_{y/x} = 2.7$ U/L), metodo confrontato P250; $y = 0.50x + 4.1$ U/L ($S_{y/x} = 4.0$ U/L), metodo confrontato P400; $y = 0.34x + 26.5$ U/L ($S_{y/x} = 3.3$ U/L), metodo confrontato NP250; $y = 0.36x + 14.8$ U/L ($S_{y/x} = 4.2$ U/L), metodo confrontato NP400. Nei 4 confronti, la frequenza di non-commutabilità era, rispettivamente, 62 %, 48 %, 14 %, 41 %; il grado di non-commutabilità dei MR non appariva correlato con la concentrazione della lipasi nel confronto con NP250, mentre appariva correlato negli altri confronti. Tre MR (10 %) risultavano non-commutabili in tutti i confronti tra metodi. In conclusione, l'approccio statistico utilizzato ha permesso di stabilire che il reagente NP250 dà luogo con minore frequenza a fenomeni di non-commutabilità.

M086

Pitto M., Ravasi D., *Li S-C., Masserini M.

STUDIES ON THE MECHANISM OF ACTION OF GM2 ACTIVATOR

Dept. Med. Chem. and Biochem., Univ. of Milan; *Dept of Biochem., Tulane Univ., New Orleans (LO)

GM2 activator protein (GM2AP) is one of the five low molecular weight proteins that are known to enhance the enzymatic hydrolysis of glycosphingolipids (GSLs) (1). GM2AP efficiently stimulates the enzymatic hydrolysis of GM2 ganglioside carried out by β -hexosaminidase A, reaction that *in vivo* is occurring in an acidic environment in lysosomes. Lack of enzyme activation by GM2AP, due to inherited deficiency of activator, causes GM2-gangliosidosis AB variant in humans, characterized by massive cerebral accumulation of GM2. Since this gangliosidosis is the most difficult to diagnose, the availability of the recombinant form of the GM2AP can be a useful tool to set up reliable activity assay and to overcome problems deriving from different degree of purification of the extracted one. For the same purpose, the optimal ratio between GM2AP and the substrate, GM2, and the molecular characteristic of the interaction, need to be fixed. In order to investigate this issues, we examined the conformational alterations of recombinant human GM2AP in the presence of the substrate GM2, or of the reaction product GM3, using circular dichroism and fluorescence spectroscopy. The experiments were carried out at pH 4.5 and 7.4 and at different ganglioside molar ratios for comparison. In addition, since also the asialoganglioside GA2 is a substrate for β -hexosaminidase A, we examined the effect of GA2 on the conformational changes of GM2AP.

Our results show that, when GM2AP is mixed with GM2 (50:1 ratio) in aqueous medium at pH 4.5, a significant conformational change occurs in GM2AP, as shown by the blue shift of the fluorescent maximum and the greater negative molar ellipticity in the CD spectroscopy. These data suggest that, upon formation of the complex with GM2, GM2AP assumes a more organized α -helical conformation. Interestingly, the ratio of 50 molar excess of GM2 in the reaction mixture is within the range of GM2/GM2AP where GM2AP exhibits efficient stimulatory activity for GM2 hydrolysis *in vitro*. Moreover, the interaction of GM2AP with GM3, the downstream hydrolytic product of GM2, did not produce such effect. In conclusion, the specific conformational changes occurring during the formation of GM2AP/GM2 complex can explain how the GalNAc in GM2 become accessible to enzymatic hydrolysis.

1) Fürst, W., and Sandhoff, K. (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochem. Biophys Acta*, **1126**:1-16.

M087

Dente B., Formicola V.*, Orefice E., Orefice S., Romano V., Spagnuolo S., Varriale M.

ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI NELLA DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

Laboratorio di Patologia Clinica - P.O. S. Paolo - ASL 1 - Napoli; *Eurospital - Trieste

Introduzione – La malattia celiaca (MC) è una intolleranza permanente alla gliadina ed alle prolamine di altri cereali, responsabile di enteropatia in individui geneticamente predisposti. Dal punto di vista diagnostico, l'impiego degli anticorpi anti-gliadina (AGA) e degli anticorpi antiendomio (AEA) ha assimilato la MC ad un iceberg di cui non si conosce ancora bene l'entità. Il bersaglio antigenico degli AEA è stato di recente identificato nella transglutaminasi tissutale (t-TG).

Scopo – Ci siamo proposti di valutare le performances degli anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) rispetto agli AEA.

Pazienti e metodi – Sono stati studiati 132 soggetti, suddivisi in 4 gruppi:

- A - 8 pazienti con MC a dieta libera;
- B - 7 pazienti con MC, a dieta senza glutine da oltre un anno;
- C - 27 soggetti sani, quale gruppo di controllo;
- D - 90 soggetti clinicamente sospetti.

Nel gruppo A e B la diagnosi di celiachia è stata posta secondo i criteri ESPGAN. Gli AEA sono stati ricercati in immunofluorescenza (Daltec), mentre gli anti-tTG sono stati dosati con metodica ELISA (Eu-tTG IgA - Eurospital).

Risultati – L'intero gruppo A è risultato positivo sia per gli AEA che per gli anti-tTG. Nel gruppo B l'esclusione del glutine dalla dieta ha comportato la negatività per entrambi i tests. Anche i 27 soggetti sani del gruppo di controllo C sono risultati negativi per entrambi i tests. Nel gruppo D, 3 soggetti hanno presentato anti-tTG; 1 di essi era positivo anche per gli AEA. La successiva biopsia intestinale ha confermato, in questi soggetti, diagnosi di celiachia.

Conclusioni – I risultati della ricerca degli anti-tTG sono del tutto sovrapponibili a quelli degli AEA nei soggetti diagnosticati (gruppi A e B). Invece nel gruppo D gli anti-tTG hanno evidenziato una maggiore sensibilità; per questo motivo potrebbero candidarsi come test sierologico di riferimento e, nello screening, potrebbero aiutarci a scoprire la parte sommersa dell'iceberg.

Bibliografia

Schuppan D., Dieterich W. et al., Nat Med 3,7, 1997.
Catassi C., Greco L., Le Scienze 345, 1997

M088

Balduzzi G., Coslovich E., (*)Matti C., (*)Giacobone E.

UF-100 SYSMEX NELLO SCREENING DELLE BATTERIURIE SIGNIFICATIVE

Servizio Analisi Chimico-Cliniche, (*)Servizio Analisi Microbiologiche, IRCCS Policlinico S. Matteo, P.le Golgi 2, 27100, PAVIA

INTRODUZIONE: La diagnosi precoce di infezioni delle vie urinarie, spesso asintomatiche, è di notevole importanza per poter procedere con una corretta terapia.

L'analisi del sedimento urinario con citometria a flusso offre un mezzo rapido di screening delle batteriurie significative, che necessitano comunque di successivo accertamento su terreno di coltura per l'identificazione dell'agente patogeno. SCOPO DELLA RICERCA: Valutazione delle batteriurie significative su 94 campioni di urine.

MATERIALI E METODI: Sono stati esaminati 94 campioni di urine (raccolta del mitto intermedio in contenitori sterili, previa accurata pulizia dei genitali) con il citofluorimetro a flusso UF-100 (Sysmex TOA distr. Dasit) e si è proceduto alla semina in terreni di coltura (Agar sangue, Mc Conkey, Slanetz).

RISULTATI: Per ogni campione sono stati considerati tre parametri: Leucociti, Bact, H-Bact. Sono stati considerati positivi i campioni con almeno uno dei parametri maggiore del range di normalità.

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Leucociti	>20/μl	<20/μl
	28	66
Bact	>500/μl	<500/μl
	11	83
H-Bact	>2000/μl	<2000/μl
	18	76
Totale UF-100	Positivi	Negativi
	33	61

I risultati dell'esame colturale (COLT), raffrontati con quelli citofluorimetrici (UF-100), sono qui sotto riportati:

	UF-100+	UF-100-	
COLT+	18	2	20
COLT-	15	59	74
	33	61	94

La sensibilità del nostro metodo è 90%, la specificità 79,7%.

CONCLUSIONI: I dati ottenuti in questo studio preliminare dimostrano che lo screening delle batteriurie significative mediante citofluorimetria può essere un valido ausilio diagnostico, meritevole di ulteriore approfondimento.

BIBLIOGRAFIA

K. Muranaka: Clinical Uses of the UF-100 for the Diagnosis of Urinary Tract Infection. Sysmex J Int 6: 46-50, 1996

M089

Nicoli M. (1); Maini M. (2)

LA GESTIONE INTEGRATA DELL'ESAME CHIMICO E CITOCHIMICO DELLE URINE: PERFORMANCE DEL SISTEMA GESTIONALE UF-LAB.

- (1) Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Verona Italy.
- (2) Dasit S.p.A. Cornaredo, Milano, Italy.

Il citofluorimetro dedicato al sedimento urinario UF100 (Sismex Corporation), ha reso possibile la completa automazione dell'esame standard delle urine. Tuttavia da un punto di vista organizzativo, l'impiego di due diversi strumenti per l'esame chimico-fisico e il sedimento urinario, pur migliorando sensibilmente la standardizzazione e la qualità del dato analitico, non sempre ha portato ad un reale ed effettivo beneficio nell'ottimizzazione del lavoro. Per questo motivo abbiamo voluto sviluppare, in collaborazione con la ditta Dasit S.p.A., un software applicativo, UF-LAB, in grado di gestire integralmente e contemporaneamente i dati provenienti dall'UF100 e dall'analizzatore dell'esame chimico-fisico, operante nel nostro Laboratorio, il Super Aution EX SA 4250 RACK (KdK Corporation).

Caratteristiche principali del software:

- Interfaccia amichevole Window NT.
- Collegamento simultaneo di più analizzatori.
- Interfacciabilità con tutti gli analizzatori della chimica secca urinaria in commercio.
- Collegamento in rete con terminali remoti.

Funzioni principali del software:

- Ricezione in tempo reale delle richieste dalla LIS.
- Ricezione in tempo reale dei dati (compresi scattergram, allarmi e flag analitici) provenienti dall'UF100 e Super Aution EX.
- Cross Check (controllo incrociato) tra quattro parametri della chimica secca e citofluorimetrici.
- Personalizzazione dei criteri di convalida.
- Validazione automatica dei campioni indicati dai criteri di convalida come "normali".
- Liste sequenziali ed aggiornate dei campioni da revisionare.
- Archivio storico.
- Gestione del Controllo di Qualità.
- Elaborazione Statistiche.

Nella nostra esperienza, con un carico di circa 400 esami urine standard al giorno, abbiamo collegato al PC gestionale UF-LAB, due UF100 e un Super Aution EX. In questo modo, il 60% degli esami vengono validati automaticamente; il 18% vengono validati manualmente dopo visione critica all'UF-LAB di valori, grafici ed allarmi analitici; nel restante 22% viene riesaminato il sedimento urinario con il sistema classico al microscopio ottico. Abbiamo inoltre ottenuto una sensibile riduzione dell'impegno del personale laureato e tecnico con una maggior qualità, sicurezza e ottimizzazione del lavoro.

M090

Gai M., Piccoli G.B., Mezza E., Vischi M., Jeantet A., Lanfranco G.

OTTIMIZZAZIONE DELL'ANALISI DEL SEDIMENTO URINARIO IN UN LABORATORIO NEFROLOGICO.

Cattedra di Nefrologia, Dialisi e Trapianto dell'Università di Torino.

L'analisi del sedimento urinario mantiene tutt'oggi un ruolo fondamentale nella diagnostica clinica generale e soprattutto in quella nefrologica. Scopo del presente lavoro è quello di proporre una standardizzazione dell'analisi del sedimento urinario in ambito nefrologico, con una procedura attualmente in uso nel nostro Laboratorio. L'esame delle urine viene eseguito sulla prima minzione del mattino (mitto intermedio) e viene esaminato entro poche ore dalla raccolta. Per prima cosa il campione di urine viene testato con strisce multireattive AMES MILES BAYER N-Multistick 10 SG, che vengono lette da un sistema automatico (CLINETEK 200). Tale striscia ha una sensibilità elevata per la sola albumina (valore soglia circa 250 mg/l), mentre è scarsamente sensibile alle altre proteine. Per tale motivo si procede al dosaggio delle proteine urinarie con metodo basato sul legame tra proteine e Rosso di Pirogallolo in SDS, con determinazione della proteinuria (mg/dl) e del rapporto proteinuria/creatininuria (mg/mg), che fornisce risultati sovrapponibili al dosaggio della proteinuria 24h. L'analisi prosegue su di un campione di urine di 10 ml, centrifugato per 10 min. a 1500 giri/min. Dal fondello di circa 0,5 ml, opportunamente risospeso, vengono posti 20 µl di urina su di un vetrino e coperti con un coprioggetto di 18x18 mm. Il vetrino viene poi esaminato con un microscopio in contrasto di fase, per meglio evidenziare gli elementi con indice di rifrazione simile a quello urinario (cilindri ialini, emazie fantasma); dapprima a piccolo ingrandimento (100x) per una valutazione qualitativa globale degli elementi figurati e per una valutazione quantitativa degli eventuali cilindri. L'osservazione viene effettuata su un numero sufficientemente elevato di campi (10-20) con particolare attenzione ai campi periferici, dove tendono ad accumularsi i cilindri. Segue un'osservazione a maggiore ingrandimento (400x) per una valutazione quantitativa e qualitativa degli elementi cellulari, e in particolare per una miglior definizione del dimorfismo delle emazie, ed una valutazione più precisa della composizione e delle dimensioni dei cilindri. In conclusione, l'esame del sedimento urinario, tutt'ora centrale nell'iter diagnostico nefrologico, merita uno sforzo di standardizzazione e di adeguamento alle esigenze attuali, sfruttandone a fondo le potenzialità diagnostiche.

T. Saito et al. Microscopic examination of urinary red blood cell for a diagnosis of the source of hematuria: a reappraisal. Eur J Lab Med, 1999; Vol. 7 (2): 55-60.

M091

Messana I., Vincenzoni F., Ferrari F., Baroni S., Forni F., Scribano D., Zuppi C.

URINE PROTON NMR SPECTRAL PROFILES OF AN IDDM PAEDIATRIC POPULATION

Istituto di Chimica e Chimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

NMR spectroscopy is a powerful technique that may be utilised in Clinical Chemistry to evaluate in a single image the status of a disease without determine all single analytes. Proton NMR spectroscopy on urine samples represents an eligible analytical method and an effective diagnostic tool mainly in pathologies in which it may be important to study not only the amount of excretion of single analytes, but also their reciprocal relationships.

Aim of our study was to apply this technique to define metabolic profiles in 25 IDDM paediatric patients without biochemical signs of renal involvement and in 25 normal subjects matched for age and sex.

¹H NMR spectra were registered at 25° C on a Varian Gemini 300 apparatus (Varian, Palo Alto, CA) operating at 300 MHz, and the metabolites were quantified using peak heights and expressed as mmoles per mole of creatinine (1).

The study of urine ¹H NMR profiles of type I diabetic patients compared to normals, have evidenced a significant (p<0.05) increased excretion of several metabolites, such as citrate, trimethylamine-N-oxide, alanine, lactate, hippurate, acetate. Moreover, spectral profiles pointed out the appearance of compounds usually not quantifiable in normal subjects, such as β-hydroxy-butyrate, acetoacetate and acetone. Furthermore, lactate and acetate increases were directly correlated to glycated Hb levels.

Since all the measured metabolites are the expression of the tubular function, the study of their changes obtained by monitoring a diabetic population may be predictive of pathological processes that occur in renal parenchima before the appearance of microalbuminuria.

(1) Zuppi C, Messana I, Forni F, Rossi C, Pennacchietti L, Ferrari F, Giardina B. ¹H NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites.

Clin Chim Acta 1997; 265: 85-97

M092

Luceri F.*, Fattori S.*, Zorn M.°, Mannaioni P.°, Messeri G.*

MISURA IN GAS CROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA DEL RAPPORTO 6β-OH-CORTISOLO/CORTISOLO: UN MARKER SPECIFICO DI INDUZIONE ENZIMATICA

*Laboratorio di Biochimica Clinica, Endocrinologica e Farmaco-Tossicologica, A.O.C., Firenze; °Tossicologia Medica, A.O.C., Firenze

Il principale metabolita non coniugato del cortisolo (UFC), il 6β-OH-cortisolo (6β-OHF) si forma mediante l'azione del citocromo P450 3A, un enzima coinvolto nella biotrasformazione delle sostanze xenobiotiche.

Il rapporto 6β-OHF/ UFC è considerato un marker specifico per valutare l'induzione enzimatica che si può verificare nell'uomo in seguito all'azione di farmaci o nel decorso di diverse patologie. Metodi analitici sviluppati precedentemente per la determinazione di questo rapporto non sono risultati sufficientemente specifici o sensibili. Noi proponiamo un nuovo metodo analitico che consente la quantificazione nelle urine in gas cromatografia-spettrometria di massa del cortisolo e del 6β-OH-cortisolo. Dopo aggiunta dello standard interno (²H₂cortisolo) ad 1 mL di urine, i campioni sono estratti con 6 mL di diclorometano. Una volta evaporata la fase organica, i campioni vengono derivatizzati per 120 minuti a 60°C con metilidrossilammina cloridrato in piridina anidra. Successivamente sono portati a secco e ripresi 20 µL di BSTFA con il 2% di TMSBr; dopo un'ora a 90°C, i campioni sono portati a secco, risospesi 30 µL di eptano e 1 µL è iniettato nel sistema GC-MS.

Questo metodo è risultato particolarmente specifico ed è caratterizzato da una buona riproducibilità (C.V. inter-day: 6β-OHF 7,95%, UFC 3,84%) ed accuratezza (recupero: 6β-OHF 90,0%, UFC 99,7%); ha un'ottima sensibilità (rapporto segnale/rumore 6β-OHF 10 con 123 pg iniettati, UFC 10 con 22 pg iniettati) ed è di semplice esecuzione. Abbiamo dapprima analizzato 20 urine di soggetti sani e abbiamo determinato il valore medio del rapporto 6β-OHF/ UFC che è risultato pari a 3,21 (range 1,30 ÷ 6,64). Successivamente abbiamo misurato questo rapporto in ulteriori quaranta urine appartenenti a 4 gruppi differenti, ottenendo i seguenti risultati: adulti in terapia metadonica (media 2,15, range 0,64 ÷ 3,54), etilisti cronici (media 10,50, range 1,28 ÷ 28,27), etilisti acuti (media 1,66, range 0,32 ÷ 3,05) e casi di intossicazione acuta (media 3,96, range 0,68 ÷ 14,26). I rapporti sono risultati significativamente diversi tra i soggetti sani ed etilisti cronici e abbiamo osservato una diminuzione dell'attività del citocromo P450 3A negli adulti in terapia metadonica. Saenger P. *6β-Hydroxycortisol in random urine samples as an indicator of enzyme induction.*

Clin. Pharmacol. Ther. 1983, 34: 818-821

M093

Luceri F.*, Chiaroni R.*, Rizzardini M.L.°, Pacenti M.°, Messeri G.*

DETERMINAZIONE AMBIENTALE E BIOLOGICA DELLA CICLOFOSFAMIDE E DEL 5-FLUORO-URACILE IN GAS CROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA

*Laboratorio di Biochimica Clinica, Endocrinologica e Farmaco-Tossicologica, A.O.C., Firenze; °Medicina Preventiva dei Lavoratori, A.O.C., Firenze

E' indubbio che l'esposizione professionale ai farmaci antitumorali rappresenta in ambito sanitario uno dei maggiori rischi alla sicurezza del personale ospedaliero addetto alla loro preparazione e somministrazione. Infatti diversi chemioterapici antitumorali rientrano nell'elenco delle sostanze cancerogene o probabilmente cancerogene per l'uomo. Onde salvaguardare la salute dei lavoratori esposti ai farmaci antitumorali sono state predisposte a livello nazionale indagini ambientali e biologiche per individuare il diverso grado di esposizione. Noi proponiamo un metodo analitico che consente la quantificazione di due farmaci antitumorali molto utilizzati, la ciclofosfamide (CFA) e il 5-fluoro-uracile (5FU), nelle urine ed nei wipe test mediante gas cromatografia-spettrometria di massa.

Per la misura del 5FU è prevista un'iniziale aggiunta dello standard interno a 2 mL di urine; in seguito i campioni vengono estratti a pH 6 con diclorometano:isopropanolo (80:20). Una volta evaporata la fase organica, i campioni sono derivatizzati con BSTFA con l'1% di TMSCI per un'ora a 70°C e 2 µl sono iniettati nel sistema GC-MS.

Per la misura della CFA è prevista un'iniziale aggiunta dello standard interno a 2 mL di urine; i campioni sono poi estratti a pH 7 con etere. Una volta evaporata la fase organica, i campioni sono derivatizzati con HFBA per un'ora a 70°C e 2 µl sono iniettati nel sistema GC-MS. L'analisi dei wipe test, effettuati in etanolo poiché rappresenta il miglior solvente sia per il 5FU che per la CFA, non prevede la fase estrattiva ma unicamente quella di evaporazione del solvente e la derivatizzazione. Questo metodo è risultato particolarmente specifico ed è caratterizzato da una buona riproducibilità (C.V. inter-day: 5FU 5,14%, CFA 4,90%), una buona accuratezza (recupero: 5FU 91,5%, CFA 96,3%) e da un'ottima sensibilità (rapporto S/N 5FU 10 con 100 pg iniettati, CFA 10 con 67 pg iniettati). Sono stati effettuati diversi monitoraggi ambientali e biologici del 5FU e della CFA in alcuni reparti dell'Azienda Ospedaliera Careggi di Firenze che hanno fornito utili indicazioni circa la pulizia degli ambienti di preparazione e di somministrazione dei farmaci chemioterapici e sul loro eventuale assorbimento da parte dei lavoratori esposti.

Ensslin AS. *Biological monitoring of cyclophosphamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs.*

Occup Environ Med. 1994;51:29-33

M094

Cangiano G.⁽¹⁾, D'Amora M.⁽²⁾, R. Garofano⁽³⁾, F. Ingala⁽⁴⁾, L. Vrenna⁽¹⁾

DETERMINAZIONE DELLE BENZODIAZEPINE URINARIE NEI SERVIZI TOSSICODIPENDENZE

Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1):

(1): Dipart. Farmacodipendenze - Polo Laboratoristico P.O. "C. Ascalesi"

(2): Responsabile Labor. Analisi - Direzione Generale

(3): Dipart. Farmacodipendenze - SERT Distretto 47

(4): Laboratorio Patologia Clinica - P.O. "C. Ascalesi"

La somministrazione di benzodiazepine in Pazienti Tossicodipendenti può rilevarsi estremamente utile nell'affrontare le forme d'ansia, l'insonnia e l'agitazione psicomotoria connessa con la sospensione di sostanze d'abuso; l'uso protratto diventa però causa di dipendenza fisica e psichica. La determinazione cromatografica delle benzodiazepine urinarie può quindi evidenziare eventuali assunzioni non previste dal programma terapeutico e conseguentemente orientare il Medico del SERT sull'opportunità di modificare la terapia farmacologica in atto.

Si è valutata la diversa risposta immunometrica riscontrata per alcune benzodiazepine ed ottenuta con il test di screening semiquantitativo EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) II plus, caratterizzato da reazioni antigeniche diazepam specifiche ed applicato sullo strumento Viva Vitalab della ditta Dade-Behring, rispetto alla tecnica di riferimento della cromatografia liquida - sistema Remedi HS - della ditta Biorad. Dall'esame dei campioni urinari provenienti dai SERT dei Distretti 44, 45, 47, 48 e 50 dell'ASL NA 1 si evidenzia che concentrazioni cromatografiche di 200 ng/ml di ciascun metabolita di benzodiazepina positivizzano il test immunometrico (anti-diazepam e calibratore lormetazepam) per diazepam (505 ng/ml), α -idrossi alprazolam (1110 ng/ml) ed N-1-idrossietil flurazepam (1524 ng/ml) mentre lo negativizzano per 7-amino flunitrazepam (64 ng/ml), 3-idrossi bromazepam (48 ng/ml), lormetazepam (0 ng/ml) e lorazepam (0 ng/ml). Quasi simile è il comportamento tra immunometria e cromatografia per oxazepam (190 ng/ml), temazepam (204 ng/ml) e nordiazepam (150 ng/ml). Pertanto, concentrazioni immunometriche inferiori al valore soglia di 200 ng/ml, non escludono la presenza di lorazepam, lormetazepam, bromazepam e flunitrazepam che vanno quindi ricercati con tecnica cromatografica.

Referenze

1. Gerra G. Tossicodipendenze ed alcolismo. *Medi Serve* 1998; 70-71.
2. Petracca A, Michelini S, Perugi G. et al. Benzodiazepine withdrawal syndrome. Problems of differential diagnosis against depression, panic attacks and generalized anxiety. *Clin. Ther.* 1991; 137: 191-7.
3. Muller WE. Using benzodiazepines for withdrawal from benzodiazepines? *Med. Monatsschr. Pharma.* 1989; 12:94-97.
4. Cangiano G. Lo stato dell'arte della farmacotossicologia nei SERT in Campania. *Atti del Convegno Dade-Behring.* 1999.
5. Vital Scientific. Manuale di introduzione al Vitalab Viva. Dokumentation Service Netherlands. 1998.
6. Biovati ML, Delor de Ferraboma F, Donzelli G, Tamburini M. Aspetti teorici e applicazioni in HPLC. *Biorad* 1995; 101-104.

M095

Panzali A.¹, Setti G.², Sandrini S.², Gervasi M.¹, Albertini A.¹, Maiorca R.²

LIMITED SAMPLING METHODS FOR CYCLOSPORINE AUC CALCULATION IN ADULTS RENAL TRANSPLANTATION.

¹III Laboratorio Analisi e ²Divisione di Nefrologia A.O. Spedali Civili di Brescia

Limited sampling models (LSMs) for predicting CsA AUCs using two or three blood sampling points have been reported: LSMs can reduce the number of blood sampling and drug assays and thereby the cost of AUC monitoring. The purposes of this study were to develop and validate the accuracy of developed LSMs for the determination of the CsA AUC post Neoral dosing in renal recipients.

Developed LSMs. Twentytwo (16 M, 6 F) stable, adult (27 to 68 y, mean 48.6 y) kidney transplant recipients receiving Neoral (1.9 to 6 mg/kg/d, mean 3.3 mg/kg/d), given twice a day, underwent full pharmacokinetic profiles (0, 2, 3, 4, 5, 6 and 12 h). Whole blood CsA was determined by EMIT Immunoassay (Dade Behring) and full AUC by the linear trapezoidal rule using seven data points. The correlation between plasma concentration at selected time points with AUC values was evaluated by stepwise regression analysis. Linear regression equations that gave the best correlation coefficients (r^2) for early sampling points were chosen as LSMs:

$$\text{AUC} = 6.4 \times C_3 + 444; \quad r^2 = 0.838$$

$$\text{AUC} = 5 \times C_3 + 1.2 \times C_2 + 204; \quad r^2 = 0.909$$

A high percentage of the AUC variability was explained by using only a concentration (C3). Including more than two concentrations improved the regression results only marginally.

LSMs validation. For models validations the predicted AUC were correlated with the full AUC in 16 different patients; none of these subjects were included in the first patients group utilized to LSMs develop.

Predictive performance indicated that developed equations were unbiased and provided sufficient precision in calculating 12-h AUC. Their mean prediction errors (MPE%) and mean absolute percentage errors (MAE%) were:

	MPE%	95%CI	MAE%	95%CI
LSM 3h	4.7	-1.6;7.9	7.0	4.2; 9.9
LSM 2 & 3h	2.7	-0.2;5.7	5.7	4.1; 7.2

An abbreviated kinetic profile, using CsA levels 3 h post neoral dosing, accurately predicted CsA AUC.

Amante A J, Kahan BD. *Abbreviated Area Under the Curve strategy for monitoring cyclosporine microemulsion therapy in immediate posttransplant period.* Clin Chem 1996;42:1294-6.

M096

Panzali A¹, Canu L¹, Viale P², Albertini A¹, Carosi P²

CONCENTRAZIONI DI TEICOPLANINA NEL SIERO DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO

¹III Laboratorio Analisi e ²II Divisione Malattie Infettive, A.O. Spedali Civili di Brescia

La teicoplanina è un antibiotico glicopeptidico a lunga emivita (60-90 h) con uno spettro d'azione simile a quello della vancomicina. In pazienti adulti con infezioni severe sono raccomandate tre-quattro dosi da carico di 400 mg ad intervalli di 12 h seguite da singola dose giornaliera di 400 mg; nell'insufficienza renale è necessario ridurre la dose di mantenimento. L'ampia variabilità interindividuale nelle concentrazioni sieriche e la dimostrata relazione tra concentrazioni ed efficacia giustificano il ricorso al TDM. Sono raccomandati livelli di valle superiori a 10 mg/L o a 20 mg/L in caso di trattamento in monoterapia per endocardite da *S. aureus*.

In seguito al riscontro di non risposta alla terapia con teicoplanina per sepsi severa e al persistere di isolati ad essa sensibili, abbiamo monitorato le concentrazioni di teicoplanina nei pazienti trattati nel nostro ospedale durante gli ultimi quattro mesi (n=14, metodo FPIA-TDx). 11/14 pazienti avevano insufficienza renale, di cui 4 in trattamento con CVVHD. Il trattamento antibiotico era iniziato per sepsi sistemica (6/14), osteomielite (3/14); polmonite (4/14) e endocardite (1/14). Solo due pazienti, entrambi in insufficienza renale, ricevevano dose da carico (6 mg/kg/12h in 1° e 2° giornata): le concentrazioni di valle di teicoplanina in 3° giornata, prima della 5° dose, erano di 13,5 e 12,5 mg/L e si consigliava dose di mantenimento di 6 mg/kg/48 h. In 7° giornata, prima dell'8° dose, le concentrazioni di teicoplanina erano di 16 e 15 mg/L. Sei pazienti giungevano alla nostra osservazione dopo oltre una settimana di trattamento: 5 avevano concentrazioni di valle > 10 mg/L (in 7°, 8°, 11°, 13° e 18° giornata); mentre i livelli del sesto paziente erano di 6 mg/L in 8° giornata. I restanti sei pazienti arrivavano alla nostra attenzione entro i primi 5 giorni di terapia: tutti avevano concentrazioni predose < 10 mg/L e si consigliava di aumentare la posologia a 6 mg/kg/12h per due giorni. 5/6 pazienti ripetevano il monitoraggio dopo il carico e in tutti le concentrazioni erano > 10 mg/L (media: 16 mg/L) prima della 5° dose del nuovo regime posologico.

Il monitoraggio delle concentrazioni di teicoplanina ci ha permesso di mettere in evidenza che raramente, nel nostro ospedale, si raggiungono concentrazioni >10 mg/L nei primi giorni di terapia, probabilmente perché trattandosi prevalentemente di pazienti con funzionalità renale ridotta, il clinico adotta la dose standard di mantenimento senza il carico.

Mac Gowan AP. *Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and therapeutic drug monitoring of glycopeptides.* The Drug Monit 1998;20:473-7.

M097

Croci D., Danieli N., Gilardoni F., Bernardi G.

NUOVO METODO IN HPLC PER IL MONITORAGGIO DELL'OXCARBAZEPINA

Istituto Nazionale Neurologico "Carlo Besta"
Via Celoria 11 – 20133 Milano
Laboratorio Analisi Tel. 02/2394246

L'Oxcarbazepina (OCBZ) è un nuovo farmaco antiepilettico recentemente commercializzato in Italia con il nome di Trileptal. L'OCBZ è un profarmaco con emivita molto breve, l'attività farmacologica è, infatti, espletata dal suo metabolita monoidrossiderivato MHD. Il monitoraggio dei livelli plasmatici di questo farmaco e del metabolita, è di particolare interesse nell'instaurazione e nel controllo di una nuova terapia o quando è somministrato in associazione con altri antiepilettici. Lo scopo di questa comunicazione è di presentare un nuovo metodo analitico in HPLC per la determinazione di OCBZ e MHD nei campioni biologici. Il metodo prevede una fase di estrazione con Diclorometano, propanolo e tampone fosfato a pH 7,5 ed una cromatografica su colonna a fase inversa (C18), con eluente: Acetonitrile (18%) e tampone fosfato a pH 6,0. La rivelazione di OCBZ, MHD e dello standard interno (CGP23827), è di tipo spettrofotometrico a 207 nm. Il metodo si è rivelato particolarmente lineare (da 0 a 50 mg/L), riproducibile (CV < 4 % per OCBZ e CV < 3,3 % per MHD) ed accurato (l'accuratezza varia fra il 97,3 ed il 108%). È di particolare importanza conoscere la terapia somministrata al paziente prima della determinazione; la presenza dell'antiepilettico Lamotrigina (LMT), infatti, può creare dei risultati di MHD falsamente aumentati dato l'analogo comportamento cromatografico di LMT nelle condizioni sopraccitate. È sufficiente modificare la concentrazione di acetonitrile nell'eluente, dal 18 al 14 %, per riuscire a separare MHD da LMT, anche se con un notevole aumento dei tempi di eluizione.

Il metodo è in uso da più di un anno presso il nostro laboratorio e si è dimostrato particolarmente semplice, affidabile, privo di interferenze (tranne quella citata) e sufficientemente rapido per il monitoraggio dei livelli plasmatici dei pazienti in terapia con Oxcarbazepina.

M098

Cangiano G.⁽¹⁾, D'Amora M.⁽²⁾, F. Ingala⁽³⁾, Vrenna L.⁽¹⁾

DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO - EMIT II PLUS - NELLE TERAPIE METADONICHE

Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1):

- (1): Dipart. Farmacodipendenze - Polo Laboratoristico P.O. "C. Ascalesi"
- (2): Referente Laboratori Analisi – Direzione Generale
- (3): Laboratorio Patologia Clinica – P.O. "C. Ascalesi"

L'efficacia della terapia metadonica e del programma terapeutico-riabilitativo non può prescindere dal riscontro laboratoristico di alcuni metaboliti di droghe d'abuso ricercati su campioni urinari di Pazienti Tossicodipendenti. Si avverte pertanto la necessità di evidenziare eventuali assunzioni di cocaina, di benzodiazepine e specialmente quelle di eroina. La determinazione del metadone urinario rappresenta a sua volta un discreto indice della somministrazione per os di metadone cloridrato.

Si è quindi valutato un nuovo dosaggio immunoenzimatico di screening semiquantitativo EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) II plus per oppiacei e metadone ed applicato sullo strumento Viva Vitalab della ditta Dade-Behring.

Col protocollo della Ditta produttrice e con l'utilizzo dei controlli a titolo noto della ditta Olympus, si ottiene, per metadone ed oppiacei, una imprecisione entro e tra le serie (n=20) di circa il 5%.

La calibrazione per gli oppiacei è stata ottenuta grazie all'inserimento di ulteriori punti di calibrazione aventi concentrazione di 150 e 650 ng/ml di morfina. Il recupero medio per il metadone è del 95.1% (91.1-101.9) mentre quello per gli oppiacei è del 102.0% (95.4-107.0). La sensibilità per metadone ed oppiacei è risultata rispettivamente di 30 e 40 ng/ml.

I profili di imprecisione evidenziano coefficienti di variazione superiori al 15% per concentrazioni maggiori di 2000 ng/ml di metadone e di 6000 ng/ml di morfina (a tali concentrazioni i recuperi sono superiori al 130%).

Pertanto con l'utilizzo del protocollo proposto o con la riduzione del già esiguo volume di urina, non è possibile ottenere direttamente (senza diluizione del campione) concentrazioni di droga sufficienti a controllare somministrazioni di metadone superiori a 40 mg/die così come le eventuali recenti assunzioni di eroina. Tali problematiche di monitoraggio non si sono evidenziate con i kits di precedente generazione.

Referenze

1. Tagliamonte A. Trattamenti della dipendenza da oppiacei con farmaci sostitutivi. Basi biologiche e farmacologiche della tossicodipendenza. Pythagora Press. 1992; 279-284.
2. Boccalon R. Tossicodipendenze e Servizi sanitari: Medicina delle tossicodipendenze 1995; 2: 64-69.
3. Ferrara SD. Reprimere, prevenire, riabilitare. L'esperienza padovana del laboratorio di tossicologia. Medicina delle tossicodipendenze 1993; 1: 38-45.
4. Cangiano G., Ciafrone A., Coppola A., D'Aniello MA et al. The methadone's dosage and the urinary creatinine in the therapies of methadone [abstract]. Clin Chem 1999; 305: T352.
5. Cangiano G. Lo stato dell'arte della farmacotossicologia nei SERT in Campania. Atti del Convegno Dade-Behring. 1999.
6. Vital Scientific. Manuale di introduzione al Vitalab Viva. Dokumentation Service Netherlands. 1998.

M099

Lavarda F., Belfiore A., Petrini C.

ANALISI DEI RISULTATI DEI DOSAGGI ESEGUITI DA UN SERVIZIO OSPEDALIERO PER IL MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEI FARMACI

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

La pratica del monitoraggio terapeutico dei farmaci si basa sulla misurazione delle concentrazioni ematiche o plasmatiche di uno o più farmaci in corso di somministrazione terapeutica. Suo scopo principale è consentire una migliore conduzione terapeutica attraverso la personalizzazione del trattamento farmacologico. Scopo del presente lavoro è quello di analizzare i risultati dei dosaggi dei farmaci eseguiti nel settore di farmacotossicologia del nostro laboratorio nel periodo aprile-luglio 1999 per un totale di 1062 determinazioni. L'analisi dei dati è stata eseguita confrontando i risultati dei dosaggi con l'intervallo terapeutico dei farmaci stessi. I farmaci presi in considerazione, con il rispettivo intervallo terapeutico, sono stati: digossina (0.9-2.0 ng/mL), teofillina (8-20 ug/mL), carbamazepina (4-10 ug/mL), fenitoina (10-20 ug/mL), fenobarbital (15-40 ug/mL), litio (0.3-1.3 mmol/L). I dosaggi sono stati eseguiti utilizzando lo strumento FLX della ditta Abbott. I risultati relativi alla fenitoina hanno dimostrato una bassa percentuale di dosaggi (37%) con valori all'interno del range terapeutico e il 10% sopra tale intervallo. Per il fenobarbital una elevata percentuale (73%) di pazienti aveva valori all'interno del range terapeutico (2% al di sopra), che nel nostro laboratorio risulta essere più ampio rispetto a quanto riportato in letteratura. Per la carbamazepina il 76% delle determinazioni è risultato all'interno dell'intervallo terapeutico (10% invece al di sopra). Per l'acido valproico la percentuale all'interno del range terapeutico è stata del 60% (nessun risultato al di sopra). Per la teofillina il 47% dei dosaggi era all'interno del range terapeutico (4% al di sopra). Per la digossina il 50% dei risultati era all'interno del range terapeutico (13% al di sopra). Per il litio, avendo il nostro laboratorio un range terapeutico molto ampio, la percentuale dei risultati all'interno di tale range è stata del 80% (nessun risultato al di sopra). Dall'analisi complessiva dei nostri dati (mediamente il 37% delle determinazioni è sotto l'intervallo terapeutico) e dalla revisione della letteratura appare evidente una certa prudenza dei clinici nella quantità di farmaco somministrata, facendo riferimento probabilmente più a criteri clinico-sintomatologici che all'intervallo terapeutico.

M100

Dalmasso G., Ollio B.

HPLC ED EMIT: DUE METODI A CONFRONTO PER LA MIGLIORE DETERMINAZIONE DELLA CSA NEL SANGUE DEI TRAPIANTATI D'ORGANO

Laboratorio Analisi P.O. Imperia ASL 1 Imperiese
Via S. Agata 57 - 18100 Imperia

INTRODUZIONE.

Scopo della sperimentazione è stato quello di mettere a confronto il metodo di riferimento in HPLC per la determinazione della ciclosporina A con quello IE in fase omogenea (EMIT), ritenuto il metodo più accreditato tra quelli immunometrici.

METODO E MATERIALI.

Per il metodo HPLC si è utilizzato quello messo a punto presso il nostro laboratorio che prevede la determinazione della ciclosporina A in un campione di sangue intero. Le condizioni operative per la separazione cromatografica sono le seguenti: sistema HPLC Shimadzu serie vp; colonna C18 nucleosil100 125 x 3 mm, 3µm; flusso 0.7 ml/min; T (°C) 65; eluente acetonitrile/acqua (65/35); detector UV 205 nm.; tr CsA 7.8 min, CsD 10.2 min; run 12 min

La tecnologia EMIT utilizzata è quella approntata dalla ditta Roche sullo strumento COBAS INTEGRA 700 sempre su sangue. Per la ricerca si sono utilizzati i campioni di sangue di 32 trapiantati (3 cuore, 2 fegato, 27 rene). Le determinazioni sono state eseguite in doppio e sono stati analizzati campioni in un range da 0 a 1500 ng/ml (per tale scopo si sono anche utilizzati campioni di pazienti non trapiantati, ma in terapia con ciclosporina).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Il n° totale di dati per ciascun gruppo (HPLC ed EMIT) è 108. Si sono utilizzati controlli Biorad con i seguenti risultati: HPLC cv% nella serie (Vm 109) = 3.0; (Vm 365) = 3.6 tra le serie (Vm 163) = 7.8; (Vm 341) = 8.2. EMIT nella serie (Vm 79) = 5.5; (Vm 339) = 4.9 tra le serie (Vm 159) = 5.9; (Vm 339) = 7.7. Sensibilità HPLC = 12 EMIT = 22 ng/ml. Linearità HPLC > 2000 EMIT = 500 ng/ml. L'analisi statistica dei due gruppi di campioni ha dato i seguenti risultati: HPLC Curtosi/DS = 31.1 > 2.6; EMIT Curtosi/DS = 34.3 > 2.6 pertanto si utilizza una statistica non parametrica. Regressione di Passing e Bablok $y = 1.0831x - 6.1367$. Coeff. correlazione Sperma $n = 0.95997$. Test di Wilcoxon per dati appaiati = 3.0754 $p = 0.0021$. Bias medio% = -3.14 HPLC/EMIT. I due metodi sono discretamente correlati pur esistendo tra i due una differenza statisticamente significativa.

Bibliografia: G. Dalmasso, G. Magrì - Estrazione SPE e analisi in HPLC per la determinazione della CsA nel sangue. *Bioc. Clinica* 1999, vol. 23, n°3.

M101

Nonnato A.¹, Aimo G.², Moscato G.², Careglio A.², Berutti C.², Mosso R.², Martinasso G.², Gariboldi A.², Pagni R.², Caropreso A.¹

VALUTAZIONE DEL SISTEMA D'ANALISI TOSSICOLOGICHE HPLC REMEDI HS QUALE COMPLETAMENTO DELLO SCREENING CON METODI IMMUNOCHIMICI

A.S.O. S.Giovanni Battista, Laboratori Centrali "Baldi e Riberi", 1)U.O.A. Chimica Analitica, 2)U.O.A. Chimica Clinica, C.so Bramante 88, 10126 (TO).

L'obiettivo del lavoro e' la verifica dell'utilita' dell'impiego del sistema in Cromatografia Liquida ad alta pressione "Remedi HS" BIO-RAD, affiancato ai comuni metodi immunochimici per analisi tossicologiche in campioni urinari provenienti dai servizi di Pronto Soccorso. A tal fine 132 campioni di urina sono stati analizzati con il metodo PFA Abbott e contemporaneamente con il sistema Remedi HS. I risultati sono riportati nella tabella.

	Immunochim.		Remedi HS	
	NEG	POS	NEG	POS
Oppiacei	87	32	92	27
Cocaina	80	20	93	7
Cannabinoidi	79	27	106	0
Amfetamine	89	3	83	9
Metadone	32	14	31	15
Benzodiaz.	77	10	72	15
Barbiturici	15	2	17	0

I dati riassunti nella tabella mostrano che il Remedi HS non può essere considerato sostitutivo del metodo immunochimico, ne valere come conferma dello stesso a causa della sua minore sensibilità nel rilevare Oppiacei, Cocaina e soprattutto l'incapacità di analizzare sostanze acide (Cannabinoidi e Barbiturici). In compenso si evidenzia una maggiore sensibilità per Amfetamine e Benzodiazepine. Per 4 campioni la separazione cromatografica è risultata essere più informativa del dato immunochimico sulla presenza di molecole di rilevanza tossicologica, non sospettate dal medico e quindi non richieste per il dosaggio. Oltre alle classi farmaco-tossicologiche in tabella, il Remedi ci ha permesso di rilevare nelle 132 urine analizzate, molecole di altre classi farmacologiche: neurolettici, antidepressivi triciclici, antibiotici, farmaci cardioattivi. La capacità del sistema Remedi HS di identificare specificamente molecole diverse della stessa classe farmacologica, nonchè i relativi metaboliti, consente di evitare situazioni di falsa positività insite nei metodi immunochimici (es. assunzione di codeina).

La necessità di ricorrere a processi di pretrattamento del campione o a modifiche nell'approccio strumentale per ottenere dal sistema il massimo dell'informazione, inficia in parte l'impiego dello strumento in tossicologia d'urgenza. Rif.: P. Demedts, A. Wauters, F. Franck, H. Neels. "Evaluation of the REMEDI Drug Profiling System". Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32 (1994) 409-417.

M102

Ionescu C.*, Jebeleanu G.**

CYTOCHROME P450 CYP2C19 DRUG INTERACTIONS

U.M.F. "Iuliu Hatieganu" Cluj _ Napoca, *Fac. of Pharmacy, Dpt. of Biochemistry. **Fac. of Medicine, Dpt. of Biochemistry. 6 Pasteur Str., 3400 Cluj-Napoca, Romania.

The CYP2C19 genetically polymorphism has been described as clinically important (1). Substrates for this enzyme include a growing list of currently used drugs such as: mephenytoin, imipramine, clomipramine, amitriptyline, mephobarbital, diazepam, progabril, omeprazole, clarithromycin. The omeprazole, a proton pump inhibitor, used for the treatment of upper gastrointestinal diseases is frequently associated with diazepam (with or without medical prescription). In such cases adverse effects such as sedation, dizziness, muscle weakness, low blood pressure, were reported. We studied a group of 30 patients treated for peptic ulcer with omeprazole, in order to see if the adverse reactions they show after a 10 mg/day diazepam dose are due to a poor metabolizer (PM) produced by the common G636A mutation (m1 mutation). Patients were informed and with their consent, blood samples were taken after a single oral dose of 10 mg diazepam at different time intervals for plasma drug concentration. The measurement was done by a gas chromatographic method developed by Xu-Ping Qin et al. (2). The genotype was determined using the PCR _ RFLP method with allele specific primers for exon 4 as described by Morais et al. (3) and Furuta et al. (4). The digested MspI fragments were analyzed on 3% agarose gel electrophoresis. Comparatively with a matched group of 50 healthy volunteers the m1 mutation was found much more frequently (14 patients and 2 healthy subjects). However only 12 patients were homozygous m1/m1 in agreement with other data as PM phenotype can be produced by association with other less frequent mutations. In conclusion the adverse reactions of diazepam are very probable due to a poor metabolizer producing mutation(s), mainly by m1 one associated with a competitive drug administration.

REFERENCES

- * Linder MW, Prough RA, Valdes R, Clinical Chemistry 1997; 43: 245 _ 266.
- * Quin Xu-Ping, Xie H-G, et al. Clin Pharmacol Ther 1999; 66: 642- 646 ,
- * de Morais SMF, Wilkinson GR, et al. J Biol Chem 1994; 269: 15419 _15422.
- * Furuta T, Ohashi K, et al. Clin Pharmacol Ther 1999; 66 : 265 _ 274.

M103

Basili E.¹, Pellegrino S.², Gallo L.², Petrarulo M.²,
Moscato D.³, Novara O.⁴, Blandamura R.¹

ANALISI DELLE FENILALCHILAMMINE NEI
LIQUIDI BIOLOGICI: LIMITI DEI TEST DI
SCREENING PER CONFRONTO CON UN NUOVO
METODO DI CONFERMA CROMATOGRAFICO

¹ Dipartimento Patologia Clinica - Area di Tossicologia
ASL n. 8 - via S. Giorgio 17/b - 10023 Chieri (Torino)
² Lab. Ospedale Mauriziano TO, ³ Baldi e Riberi ASO
S.Giov.Battista TO, ⁴ Lab. Ospedale Martini ASL 2 TO

Scopo del lavoro: Valutazione delle problematiche relative alla determinazione delle fenilalchilammine con test di screening e della loro separazione mediante un nuovo metodo di conferma cromatografico per rilevare: amfetamina (A), metamfetamina (MA), metilendirossimetamfetamina (MDMA, "ecstasy"), metilendirossiamfetamina (MDA), metilendiossietilamfetamina (MDE). Le ultime tre rappresentano alcune tra le droghe di sintesi di nuova generazione, il cui consumo è in aumento tra i giovani a scopi ricreazionali. I metodi immunochimici qualitativi per classe di sostanza producono risposte non sempre attendibili (falsi positivi e falsi negativi). Casistica e metodi: 55 campioni urinari di tossicodipendenti in trattamento presso l'U.O.A. Ser.T. dell'ASL 8, selezionati per positività al metodo KIMS-Roche e/o sospetto clinico di assunzione e successiva analisi con FPIA-Abbott (n=55) e EMIT-Dade Behring (n=30); cut-off dei tre metodi: 1000 ng/mL. Tutti i campioni sono stati processati mediante procedura di estrazione in fase solida e successiva analisi mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) utilizzando un cut-off 100 ng/mL (1).

<u>Risultati:</u>	KIMS +/-	FPIA +/-	EMIT +/-
HPLC + (n=28)	23/5	22/6	12/7
HPLC - (n=27)	21/6	3/24	1/10

Casi positivi per singole sostanze ricercate: 18 (A), 5 (MDMA/MDA), 2 (A/MDMA/MDA), 1 (A/MA), 1 (MA), 1 (MDE); tra questi, due casi non sono stati evidenziati da nessuno dei tre metodi di screening.

Discussione e conclusioni: Il lavoro ha consentito di verificare, oltre alla variabilità del reperto da strada desumibile dalle sostanze separate in HPLC, i limiti dei test di I livello. Le numerose molecole di questa classe, in continua evoluzione per il traffico illecito, rendono indagine la loro identificazione se non si dispone di metodiche gascromatografiche con spettrometria di massa (GC/MS) ed aggiornate librerie tossicologiche. La presenza di altre fenilalchilammine, differenti da quelle considerate, potrebbe essere rilevabile con i test di screening ma non con la metodica cromatografica utilizzata, comunque proponibile per le sue caratteristiche analitiche (sensibilità, accuratezza e costi contenuti). Considerando che errori analitici possono avere ricadute sociali, amministrative e giudiziarie, il Laboratorio deve perseguire la massima affidabilità, anche attraverso l'integrazione culturale tra competenze diverse (cliniche e medico legali).

Bibliografia: 1-Pisternick W et al. J Chromatogr 1997; 688: 63-69

M104

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

STUDIO DI PAZIENTI IN TERAPIA CON
NALTREXONE

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

Per pazienti accuratamente selezionati una terapia farmacologica a base di antagonisti degli oppiacei può essere utile, ma spesso i risultati dei controlli eseguiti con reattivi immunochimici risentono del fenomeno della crossreattività. Scopo di questo lavoro è la ricerca di un criterio di "cutoff allargato" da utilizzare per questi pazienti. Materiali e metodi. I campioni di urina di un gruppo di 20 pazienti in terapia da almeno un mese con 50 mg/die di naltrexone (Antaxone) sono stati esaminati per la ricerca degli oppiacei sia con un metodo immunochimico di screening (reattivi CEDIA applicati su HITACHI 717) sia con il metodo cromato-grafico di conferma (REMEDI HS). Risultati. Il metodo immunochimico ha rilevato in alcuni casi (30%) una debole positività per gli oppiacei; tra essi il 15% è risultato superiore al limite cutoff. In questi ultimi l'analisi cromatografica ha rilevato l'assoluta assenza di morfina, ma anche la presenza di un picco di beta-naltrexolo di dimensioni cospicue, molto maggiori di quelle riscontrate nelle urine di altri pazienti che seguono la stessa terapia. In questi casi il risultato con il metodo CEDIA era di 400 nanog/mL. Conclusioni. Le molecole della morfina e del beta-naltrexolo sono molto simili, ma finora non è stata calcolata la cross-reattività dell'antagonista con i reattivi CEDIA. E' ragionevole usare per questi pazienti un cutoff di 500 nanog/mL e soprattutto confermare cromatograficamente i risultati preliminari, considerando che in questa popolazione diventa frequente la positività alla cocaina.

Baccini C. : Sostanze di abuso e tossicodipendenze: una visione molecolare del fenomeno droga - Sorbona, 1997

M105

Moscato D., Berutti C., Mosso R., Giaccone M., Bruno A., Gruosso G., Pagni R.

VALUTAZIONE DI UN METODO EMIT PER IL DOSAGGIO DELL'ACIDO MICOFENOLICO SU ANALIZZATORE VITALAB – VIVA

Laboratorio Analisi Chimico-Clinico A.O S.Giovanni Battista-Torino (Molinette)

PREMESSA: il micofenolato mofetile (MMF) è un farmaco immunosoppressore recentemente introdotto nella pratica clinica. Viene attualmente utilizzato, in associazione, dalla Div. Univ. Nefrologia della nostra A. O., per la prevenzione del rigetto nei pazienti sottoposti a trapianto renale quale farmaco alternativo all'Azatioprina. Il MMF in vivo viene rapidamente idrolizzato ad acido micofenolico (MPA) che ne è il principio attivo.

METODI: abbiamo valutato alcune caratteristiche del metodo EMIT di dosaggio dell'MPA, recentemente commercializzato dalla ditta Dade-Behring. Questo metodo utilizza una tecnica in fase omogenea, basata sulla competizione di legame tra l'analita presente nel campione ed il farmaco marcato con l'enzima G6PDH. La metodica è stata applicata su autoanalizzatore per immunodosaggi Vitalab - VIVA (Dade-Behring). I reattivi sono pronti per l'uso, il campione di elezione è il plasma (sangue con EDTA in provetta Hemogard-Vacutainer Becton-Dickinson), non richiede pretrattamento ed i tempi di analisi sono di 5' per il primo risultato e di 30" per i successivi.

IMPRECISIONE: la curva di calibrazione, allestita con sei calibratori (valori di concentrazione da 0 a 15 mcg/ml), è risultata stabile per almeno 5 giorni. L'accettabilità della calibrazione è stata valutata in base ai valori forniti dai plasmidi di controllo Dade-Behring. I tre controlli del kit, privi di valori di riferimento in quanto il kit da noi provato nel 1999 era considerato sperimentale, forniva i seguenti valori (media e range) dosando 3 replicati in 3 serie diverse: 1.10 (0.86-1.29), 8.14 (6.52-9.77) e 12.87 (10.29-15.44).

La precisione è stata testata mediante venti replicati dei 3 campioni di controllo ripetuti nella stessa seduta analitica (intra-serie) ed è stata valutata con gli stessi controlli in 40 diversi giorni (tra serie). I coefficienti di variazione nella serie oscillano tra il 4.3% ed il 7.9%; quelli tra le serie sono compresi tra 9.1% e 10.7%.

SENSIBILITÀ: la sensibilità analitica è stata calcolata dosando per 10 volte il plasma di otto pazienti portatori di trapianto renale, che non avevano ricevuto MMF. Calcolando la media più 3 volte la deviazione standard, la sensibilità è risultata essere 0.20 mcg/ml.

Questi dati confermano quanto riportato in precedenti studi effettuati utilizzando la metodica EMIT su analizzatori della serie COBAS MIRA (Roche).

CONCLUSIONI: il metodo di dosaggio del MPA disponibile in commercio si è dimostrato praticabile e con errori analitici compatibili con l'uso clinico del nuovo immunosoppressore.

M106

Martinelli F., Grassi E., Speziani F., Scarcella C.*

IL LABORATORIO DI SANITA' PUBBLICA NEL MONITORAGGIO DELLE DROGHE D'ABUSO

U.O. Medico-Micrografica e Tossicologica, ASL di Brescia, *Direzione Sanitaria, ASL di Brescia

L'abuso delle sostanze stupefacenti e psicotrope può essere fronteggiato con strategie di prevenzione, terapia e riabilitazione, contraddistinte dalla comune esigenza dell'accertamento chimico-tossicologico. Ai laboratori di Tossicologia Clinica è attribuito il compito di procedere ad analisi chimico-tossicologiche utili nei casi di intossicazione acuta e cronica di rilevanza clinica, non aventi un particolare significato forense. Nel dosaggio delle droghe d'abuso vengono distinti due livelli di analisi: quello di screening e quello di conferma. Nel nostro laboratorio tossicologico afferiscono tutti i campioni provenienti dai SERT dell'ASL di Brescia e alcuni campioni provenienti da strutture militari. Le sostanze stupefacenti ricercate sono quelle di maggior rilevanza sociale: oppiacei, cannabinoidi, cocaina, amfetaminici e benzodiazepine. La tecnica immunochimica di screening utilizzata era basata sul principio della competizione di legame con l'anticorpo tra l'analita coniugato a microparticelle (MPR) e l'analita presente nel campione. I metaboliti, se presenti, competono con MPR per l'anticorpo, diminuendo la velocità di aggregazione. Dei 3016 campioni urinari analizzati, nel mese di marzo, ne sono risultati positivi 408 (16,5%) agli oppiacei su un totale di 2480 richieste, 332 (14,1%) alla cocaina su un totale di 2352 (14,1%) richieste, 64 (18,2%) ai cannabinoidi su un totale di 352 (18,2%) richieste, 12 esami richiesti per la rilevazione delle benzodiazepine hanno mostrato tutti positività. Nessun campione e risultato positivo alle anfetamine su un totale di solo 4 richieste, mentre, come atteso, 236 (70,2%) campioni erano positivi al metadone su un totale di 336 (11,1%) richieste. La popolazione più numerosa comprendeva la fascia d'età tra i 27 e 32 anni, con 952 soggetti analizzati.

Dai dati ottenuti si evince che i SERT afferenti al nostro servizio richiedono con maggiore frequenza la rilevazione di due droghe d'abuso: oppiacei (82,2%) e cocaina (78,1%), mentre per i cannabinoidi (11%), benzodiazepine (0,4%) ed anfetamine (0,1%) sembra essere di secondario interesse conoscerne l'assunzione da parte dei pazienti da loro osservati, sebbene i cannabinoidi e gli anfetaminici, da indagini epidemiologiche, siano indicati come sostanze stupefacenti di maggior rilevanza sociale. Si segnala inoltre la scarsa richiesta di analisi per la rilevazione di metadone (11,1%) utilizzato come trattamento terapeutico. Nella disintossicazione e nella riabilitazione con farmaci l'analisi chimico-clinica costituisce, a nostro avviso, l'indispensabile premessa all'inizio e alla continuazione del trattamento.

M107

De Paoli M.^a, Fassari S.A.^a, Varagnolo C.^a, Rossi C.R.^b, Bonvicini P.^a, Plebani M.^a

DETERMINAZIONE CROMATOGRAFICA DELLA ADRIAMICINA

^aServizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova

^bClinica Chirurgica Generale II, Università di Padova, Padova

L'adriamicina è un antibiotico antineoplastico attivo contro una vasta gamma di tumori il cui utilizzo clinico è limitato dalla elevata tossicità sistemica.

Lo scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo in HPLC, specifico e sensibile, per la determinazione dell'adriamicina in diversi fluidi biologici (siero, urina, liquidi di perfusione e dialisi) per valutare modalità diverse di somministrazione.

L'adriamicina pura è stata fornita dalla Pharmacia Upjohn (Italia). Il metodo utilizzato è il seguente: a 0,5 mL di campione (o calibratore) vanno aggiunti 0,5 mL di acetonitrile; dopo vigorosa agitazione si centrifuga per 5 min a circa 4000 g e si preleva il surnatante per l'analisi cromatografica effettuata mediante una colonna C-18 DB a fase inversa (4,6 mm x 150 mm, dimensione delle particelle 3 µm, con una precolonna a fase inversa C-18, 3,2 x 20 mm) con rivelazione fluorimetrica (ecc 480 nm, em 540 nm).

La fase mobile era costituita da una miscela formata per il 70% da tampone fosfato 0,2 mol/L contenente 2 mL/L di trietilammina e aggiustato a pH 3,0 con acido ortofosforico e per il 30 da acetonitrile.

Il flusso era regolato a 1,0 mL/min ed il volume iniettato a 50 µL. Il tempo di ritenzione era di circa 4 min. In queste condizioni il limite di rivelabilità è risultato 0,02 µmol/L. L'identità del picco nei campioni è stata confermata tramite prove di aggiunta e mediante spettro di assorbimento. L'imprecisione nella serie è risultata soddisfacente (CV% di 6,5 alla concentrazione di 15 µmol/L, n=15). Nelle prove di aggiunta il ricupero medio (+/- DS) è risultato 92 % (12).

I primi risultati su campioni biologici ottenuti dopo somministrazione di 100 mg (184 µmol) di adriamicina sciolti in 5 litri con una circolazione limitata al distretto peritoneale, hanno fornito i seguenti valori:

sangue, 2 µmol/L a 15 min;

urina, 1,8 µmol/L a 60 min;

liquido di perfusione, 24 µmol/L a 15 min.

M108

Dominijanni A., Gareri P., De Fazio P.*, Segura Garcia C.*, Stilo M.G.*, Amati A.*, Gulletta E., De Sarro G.

RELATIONSHIP BETWEEN PLASMA LEVELS OF MELATONINE AND CLINICAL EFFICACY OF FLUOXETINE IN MAJOR DEPRESSION DISORDER

Chairs of Clinical Pathology, Pharmacology* and Psychiatry, Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Catanzaro

Recent interest in clinical practice is derived from the possibility of establishing an appropriate antidepressant drug regimen on the basis of plasmatic concentrations, but up today, data are controversial. The aim of the present study was to evaluate a possible relationship between plasma levels of melatonin with short term clinical response in a group of patients affected with Major Depressive Disorder (MDD). Patients, aged from 35 to 65 years, female sex 14, male sex 8, treated with fluoxetine (20mg/day), were evaluated through Montgomery-Asberg Depression rating Scale (MADRS), Raskin Depression Scale (RDS) and Covi Anxiety Scale (CAS). We have examined the excretion of the urinary metabolite of melatonin, 6-sulphatoxymelatonin (6-SMT), in 10 normal subjects and in all 22 patients.

Psychopathological modifications as well as plasmatic levels of fluoxetine were evaluated after 4 (T1), 8 (T2) and in some subjects 16 weeks of treatment (T3). Anxiety and depression resulted both significantly decreased at T1, T2 and T3. Evidence of a significant relationship between therapeutic efficacy and increase plasma levels of melatonin was evident in approx 40% of patients whereas a reduction of plasma levels of melatonin was observed in 30% of patients having an improvement of depression. Further investigations are necessary in order to evaluate possible changes in the acrophase and their relationship with the timing of the circadian system.

Healy D; Waterhouse JM. The circadian system and the therapeutics of the affective disorders.

Pharmacol Ther 1995 Feb;65(2):241-63:

Goldenberg F. Sleep and biological rhythms in depression. Changes caused by antidepressants.

Neurophysiol Clin 1993 Dec;23(6):487-515

DE KONINCK J. BIOLOGICAL RHYTHMS ASSOCIATED WITH SLEEP AND PSYCHOLOGICAL ADJUSTMENT.

J Psychiatry Neurosci 1991 Sep;16(3):115-22

M109

Bucci M.⁽¹⁾, Villani A.⁽¹⁾, Sebastiano C.⁽¹⁾, Manoni R.⁽²⁾.

CERTIFICAZIONE UNI EN ISO 9002 (Ed. 1994):
PERCORSO FORMATIVO DEL PERSONALE DEL
LABORATORIO ANALISI DELL'OSPEDALE DI
LARINO

(1) – Lab. Analisi P.O. “G. Vietri” Larino – ASL N° 4
Basso Molise; (2) – Lab. Analisi P.O. “A. Cardarelli”
Campobasso – ASL N° 3 Centro Molise.

Negli anni 1992-1999 nel S.S.N. sono stati introdotti importanti meccanismi di competitività ed efficienza volti al contenimento dei costi ed al miglioramento della Qualità con l'obiettivo della soddisfazione del paziente/utente e della efficienza interna. Solo il cambiamento culturale che coinvolga tutti gli operatori sanitari può permettere il raggiungimento di tale obiettivo.

Il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Larino ha deciso di introdurre un Sistema Qualità conforme alla normativa internazionale UNI EN ISO 9002 (Edizione 1994) progettato e realizzato con la partecipazione del personale direttivo e di quello operativo. La pianificazione ha previsto 4 fasi:

FASE 1 – Impostazione del Progetto e definizione dei requisiti,

FASE 2 – Progettazione del Sistema Qualità del Laboratorio,

FASE 3 – Attuazione del Sistema Qualità,

FASE 4 – Certificazione.

L'approccio al programma certificativo è stato del tipo top-down ed è partito con il coinvolgimento e la formazione della Direzione del Laboratorio per scendere agli altri livelli dirigenziali, al personale tecnico, infermieristico, amministrativo ed ausiliario. Lo staff dirigenziale così preparato ha coinvolto gli operatori nella stesura del Manuale della Qualità, delle Procedure e delle Istruzioni Operative. Ciò ha permesso una rapida elaborazione dell'intero Sistema Documentale ed un efficace riesame del Sistema Qualità. L'intensa attività di Formazione ha consentito l'addestramento pratico sull'innovazione dei processi e sulle “Registrazioni della Qualità”. Una costante attività di Controllo e di Verifica ha permesso di evidenziare il grado di attuazione del Sistema Qualità e di proporre eventuali miglioramenti.

La fase finale ad opera dell'Ente terzo prescelto, accreditato SINCERT, si è attuata in due steps:

- Verifica e Valutazione del Sistema Documentale, che è risultato conforme alla NORMATIVA UNI EN ISO 9002;

- Verifica Ispettiva dell'Ente terzo presso il Laboratorio, che ha portato al rilascio del CERTIFICATO di conformità alla NORMATIVA.

M110

Bartoli M., Dalla Benetta C., Daghetta L.

LA CERTIFICAZIONE DEL LABORATORIO: UN
TRAGUARDO RAGGIUNTO

Laboratorio Analisi Sant'Ambrogio - Vigevano (Pv)

Il nostro laboratorio ha intrapreso la via dello sviluppo di un sistema di qualità secondo la normativa UNI EN ISO 9002 all'inizio del 1999 per l'adeguamento ai requisiti dell'accreditamento regionale e per introdurre un Sistema organizzativo capace di rispondere alle esigenze di maggiore efficienza, efficacia e trasparenza dettate da tutte le parti interessate (Cittadini, Regione, ASL, Medici, Dipendenti, Direzione) ed è stato coinvolto tutto il personale per le fasi sotto riportate:

1) Progettazione del Sistema Qualità del laboratorio e definizione della struttura documentale costituita dal manuale della qualità, dalle procedure e le istruzioni operative e dalle registrazioni della qualità.

2) Definizione degli obiettivi di qualità, descrizione della politica di qualità del Laboratorio, predisposizione dell'organigramma e dei mansionari, formazione, addestramento e qualificazione del personale.

3) Identificazione ed analisi dei processi del Laboratorio biologico nelle fasi preanalitica, analitica e postanalitica, con particolare attenzione alle fasi pre e post analitiche dove si evidenziano il maggior numero di non conformità.

4) Identificazione delle modalità di controllo dei processi e predisposizione delle procedure documentate e delle registrazioni relative.

5) Identificazione delle modalità per il miglioramento delle attività dell'intero processo e predisposizione delle procedure e delle registrazioni relative.

6) Questionario di valutazione sul servizio offerto.

7) Carta dei servizi.

Il sistema è stato applicato, ne è stata verificata la sua adeguatezza alla Norma di riferimento e la sua efficacia per le necessità delle parti interessate ed il Laboratorio è stato certificato da BVQi nel mese di Aprile 2000.

M111

Rossi L., Lucchetti A., Innocenti B.

OTTIMIZZAZIONE DEI CARICHI DI LAVORO NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE DIABETICO

U.O. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche I Azienda Ospedaliera Pisana - Pisa

Il monitoraggio del paziente diabetico richiede l'esecuzione di una serie di esami che siano in grado di fornire in breve tempo un quadro reale delle condizioni generali, individuando e prevenendo le numerose complicanze che spesso si legano a tale patologia. Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione del Tempo Totale di Analisi (TAT) applicata alla possibilità di poter eseguire il nostro profilo diabetico completo (glicemia, glicosuria, fruttosamina, emoglobina glicata) su un unico analizzatore di chimica clinica. 400 profili diabetici completi sono stati eseguiti nel settore di chimica clinica su analizzatore automatico Hitachi 917 (Roche Diagnostics). Metodo attualmente in uso: una provetta di plasma EDTA per il dosaggio dell'HbA1c (Diamat, Biorad), una provetta di plasma litio-eparina per il dosaggio di glicemia e fruttosamina, una provetta di urine per il dosaggio della glicosuria. Nuovo metodo: una provetta di plasma litio-eparina per il dosaggio di HbA1c, glicemia, fruttosamina ed una di urine per il dosaggio della glicosuria. Il grosso vantaggio del profilo unico deriva dal poter coprire l'intera gamma di esami con una sola provetta di plasma ed una di urine, centrifugando il campione utilizzato precedentemente per l'HbA1c per il dosaggio di glicemia e fruttosamina.

8.50 am	ACCETTAZIONE CAMPIONI (HITACHI 917)
9.00 am	PRETRATTAMENTO HbA1c
9.10 am	CENTRIFUGAZIONE
9.20 am	CARICAMENTO PLASMA, URINE ED EMOLISATI
9.40 am	REFERTAZIONE E FINE LAVORO
8.50 am	ACCETTAZIONE CAMPIONI (HPLC)
9.00 am	PRETRATTAMENTO HbA1c, CENTRIFUGAZIONE PLASMA GLICEMIA/FRUTTOSAMINA
9.10 am	CARICAMENTO E CAMPIONAMENTO PLASMA/URINE - INCUBAZIONE HbA1c
9.30 am	FINE LAVORO HITACHI 917
9.40 am	TERMINE INCUBAZIONE HbA1c E CARICAMENTO
10.10 am	FINE LAVORO BIORAD E REFERTAZIONE

Ridotto numero di campioni, riduzione dei tempi morti per le fasi pre analitiche, il risparmio economico per la spesa del reagente, il minore impiego di personale (un solo operatore) ed i tempi di risposta sicuramente velocizzati rendono la scelta del profilo su un unico analizzatore una soluzione ottimale non solo se apportata alla gestione clinica del paziente diabetico ma anche, più in generale, al miglioramento dell'efficienza e della produttività di un laboratorio analisi.

M112

Iudicone P., Testi M., Candido A., Moschetti A., Miceli M.

ASSESSMENT OF A MOLECULAR QUALITATIVE TEST FOR HCV-RNA DETECTION IN THE SETTING OF BLOOD DONOR SCREENING

Centro Nazionale Trasfusione Sangue - CRI - Roma

The application of the nucleic acid amplification technology (NAT) to the donor screening for the detection of viral genome has its greatest impact for HCV because of the long seronegative window period of this infection. NATs adequate for blood screening are qualitative tests which can be applied to screen single units or plasma mini-pools. The molecular approach for virus screening introduces a new technology in the setting of blood banks: thus a protocol for validation of the analytical procedure to define its sensitivity and the assessment of its reliability when used in routine are essential prerequisites. To this purpose Guidelines PA/PH/OMCL have been published by the Council of Europe particularly for the application of NAT to HCV-RNA detection in plasma-pools. The following scheme was applied in our lab for the HCV-RNA screening implementation by testing 20 sample plasma mini-pools:

- validation of the analytical procedure with respect to specificity, sensitivity and cross contamination
- participation to an International Proficiency Programme to assess the quality of performance of the employed technology
- self-surveillance of the single analytical run by testing a run control at the concentration 3 x Cut Off (daily) or 1x Cut Off (weekly).

The method used was Cobas Amplicor HCV-RNA v2.0 modified with the addition of an ultracentrifugation step. The validation protocol was performed by using the Working Reagent ISS 0498 calibrated against the WHO HCV International Standard (96/790). In our hands the sensitivity of the test calculated by Probit method was 23 IU/mL. A plasma mini pool spiked with the 0498 standard was considered a suitable run control and added to each run as "Quality Control". The results are reported in the table:

Run Control	3 x CO	1 x CO
Mean (O.D.)	3.320	1.800
SD	0.48	0.40
CV %	15.35	21.10
Total samples	87	15

The use of the Run Control at appropriate concentrations can be considered a satisfactory system to ensure that the reliability of the analytical procedure used in routine screening is maintained over the time.

M113

¹Micelli M.,²Correale M.,³Iacobacci A.,⁴Giannattasio S.

LA BIOLOGIA MOLECOLARE NEI LABORATORI CLINICI DELLA REGIONE PUGLIA: INDAGINE TRAMITE QUESTIONARIO

¹Laboratorio di Coagulazione - Az. Osp. Policlinico, Bari;
²Laboratorio Analisi-IRCCS De Bellis, Castellana G (Bari);
³Laboratorio Analisi - CCR., Bari;
⁴CNR-Centro Studi sui Mitochondri e M. E., Bari.

Introduzione: La possibilità di avere dati aggiornati sullo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare nel laboratorio clinico è un prerequisito sia per l'implementazione dei servizi di diagnostica molecolare a livello territoriale sia per la standardizzazione e lo sviluppo di sistemi di controllo di qualità a livello regionale. E' stata perciò effettuata un'indagine conoscitiva relativa alla diffusione delle metodologie di biologia molecolare nei laboratori clinici della regione Puglia tramite questionario informativo al fine di valutare i diversi campi e modi di applicazione delle tecniche di biologia molecolare.

Le informazioni raccolte attraverso il questionario sono state anche confrontate sia con quelle contenute nella determinazione dirigenziale n.130 del 14.05.99 della Regione Puglia che con quelle contenute nel sito Internet GENET (<http://www.genet.it>)

Risultati: Sono stati raccolti dati relativi a 75 laboratori pubblici pugliesi, su un totale di 105. Il 47% (35 laboratori) utilizza tecniche di biologia molecolare per almeno un tipo di indagine nei seguenti settori di applicazione: microbiologia, malattie genetiche, oncologia e citogenetica, sia a livello diagnostico che di ricerca. Le analisi molecolari effettuate con maggiore frequenza sono risultate, nell'ordine, la ricerca dell'HCV, dell'HIV e dell'HBV. Le indagini sulle malattie genetiche sono effettuate, per la maggior parte, presso laboratori già riconosciuti come Servizi di Genetica Medica.

Conclusioni. Il confronto tra i dati raccolti mediante il questionario e le potenzialità esistenti che si ricavano dalla deliberazione della Regione Puglia indica che le tecniche di biologia molecolare sono sufficientemente diffuse nei laboratori clinici della Regione Puglia. La larga diffusione nel settore della microbiologia è dovuta anche all'impiego di kit commerciali e di sistemi automatici. Conoscere l'effettiva distribuzione sul territorio pugliese dei laboratori in grado di fornire indagini di biologia molecolare potrà permettere di ottimizzare le risorse in un settore del laboratorio che ha ancora costi piuttosto elevati in termini di personale specializzato, apparecchiature e reagenti.

Bibliografia:

1. Rapporto del gruppo di Lavoro dell'Istituto Superiore di Sanità sulle Linee Guida per Test Genetici, <http://www.iss.it>
2. La genetica nella programmazione nazionale e regionale. Analysis 1991; 3:99-154

M114

Rosso D. , Patrucco G.

DETERMINAZIONE IN HPLC DELLA TRANSFERRINA DESIALIZZATA PER LA VALUTAZIONE DELL'ABUSO CRONICO DI ALCOL: VALUTAZIONE PRELIMINARE

Laboratorio Analisi Ospedale S. Andrea ASL 11, Vercelli

La transferrina carboidrato deficiente (CDT), che è attualmente il marker biochimico più attendibile per monitorare l'abuso cronico di alcol e per seguire trattamenti di disintossicazione, è normalmente dosata con metodi immunochimici con misura turbidimetrica dopo pretrattamento dei campioni di siero su colonnine a scambio ionico. I risvolti medico-legali implicati nella valutazione di questo parametro richiederebbero una tecnica analitica alternativa ai metodi immunologici adatta alla conferma di questi valori.

Lo scopo di questo lavoro è quello di trovare una correlazione tra i valori di CDT ottenuti con test immunologici e valori ottenuti in HPLC.

La ricerca si basa sulla messa a punto di un metodo in HPLC per il dosaggio quantitativo della transferrina desializzata. I campioni di siero vengono sottoposti a pretrattamento di saturazione con Fe³⁺ (FeCl₃ e NaHCO₃) per separare le isoforme. Le lipoproteine sono precipitate con solfato di destrano e CaCl₂ e separate mediante centrifugazione; 100 µl di campione vengono iniettati in una colonna a scambio anionico UNO Q2 BIORAD ed eluiti a temperatura ambiente con un gradiente di due tamponi a diversa forza ionica ad un flusso di 0.8 ml/min per 40'. Per evitare di perdere efficienza nella separazione cromatografica occorre prestare particolari cure alla colonna lavandola con CH₃COOH e H₂O (1:1) e con metanolo dopo una decina di campioni. La rivelazione delle assorbanze a 460 nm permette di ottenere un segnale che è solo del 10% rispetto al segnale che si otterrebbe a 280 nm ma più selettivo per la transferrina.

Sono stati analizzati 50 sieri provenienti dal Servizio di Medicina Legale, dal Sert e dall'Ambulatorio. I campioni sono stati dosati prima con il metodo immunologico che ha fornito il 37.5 % di valori di CDT minori di 6 (negativi), 23% di valori di CDT compreso tra 6 e 7 (positivi), 29 % di CDT compreso tra 7 e 8 e un 10.5 % dei campioni con valori di CDT maggiore di 8.

Con il metodo cromatografico, che separa 5 isoforme, i primi risultati evidenziano una diminuzione della pentasialo transferrina in tutti i campioni risultati positivi con il metodo immunologico ed una riduzione dell'area delle isoforme carboidrato deficienti (asialotransferrina e disialotransferrina) per i campioni negativi con metodo immunologico.

M115

Fermo I., Arcelloni C., Paroni R.

HPLC SCREENING METHOD FOR CYSTINE IN URINE

Lab. Chromatographic and Separative Techniques, IRCCS H. San Raffaele, Via Olgettina 60, Milano.

Cystinuria is an autosomal recessive disorder characterized by a defect in intestinal and renal tubular transport of dibasic amino acids which results in excessive urinary excretion of cystine (CYSS). In the clinical chemistry laboratory the diagnosis of cystinuria is based on the colorimetric assay involving cyanide-nitroprusside test followed by quantitative analysis of single urine thiols or on the use of an Amino Acid Analyzer.

Here we describe a rapid and simple HPLC thiol-specific procedure for identifying cystinuric patients based on total urine cysteine determination. The procedure includes the addition of cysteamine (IS) as internal standard, the reduction of disulphide bonds by sodium borohydride and the derivatization by ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate (SBD-F).

The chromatographic apparatus was a Beckman System Gold and consisted of a monopump mod.116, an autosampler mod.507 and an analog interface mod.406 connected with a Shimadzu mod. RF 551 fluorimetric detector set to $\lambda_{ex} = 385$ nm and $\lambda_{em} = 515$ nm. The analysis was an isocratic run performed on a Beckman Ultrasphere ODS column (150x4.6 mm ID, 5 μ m) by using acetic acid-acetate buffer pH 5.5, containing 30 mL/L of methanol at flow-rate of 1 mL/min. Cysteine and IS eluted at 3.0 and 6.3 min, respectively and total HPLC run lasted 7.0 min.

Within- and between-day variabilities of seven repetitions of a urine sample with total CYSS level of 105.0 μ mol/L were 3.3% and 5.0%, respectively. Linear regression analysis in the 7.5-600.0 μ mol/L range yielded $y = 0.005x + 0.5$, $r = 0.999$. The analytical recovery was $99.0\% \pm 1.76$ ($n=5$).

Total CYSS concentrations found in 80 urines from healthy donors were 145.0 ± 50.0 μ mol/day and 16.0 ± 5.0 mmol/mol creatinine (mean \pm SD), while two cystinuric probands showing CYSS levels of 2962.0 μ mol/day and 3290 μ mol/day and 290.0 mmol/mol creatinine and 600 mmol/mol creatinine, respectively, were classified as cystinuric patients. These CYSS urine values agreed with concentrations reported in literature (1).

To conclude this method represents a valid and inexpensive alternative to conventional Amino Acids Analyzer for screening cystinuric patients.

1. J Livesey, JG Donnelly, DS Ooi. Clin Chem 42, No.10, 1996.

M116

Villani A., Barletta A., Salerno D.M.M., Scutellà M., Petrilli G.A., Sebastiano C., Bucci M.

SCREENING BIOCHIMICO PER LA DIAGNOSI PRENATALE DI SINDROME DI DOWN NELLA POPOLAZIONE MOLISANA.

Laboratorio Analisi P.O. "G. Vietri" Larino (CB) A.S.L. n° 4 "Basso Molise"

I programmi di screening basati sull'impiego di alcuni test biochimici consentono di valutare il tasso di rischio di una gestante di avere un feto affetto da Sindrome di Down e da difetti del tubo neurale⁽¹⁾. In questo lavoro presentiamo la valutazione dei risultati dello screening per la diagnosi di SD, effettuato sulla popolazione afferente al P.O. "G. Vietri" di Larino (CB) negli anni 1998, 1999. Per la determinazione della AFP, della HCG totale e di uE3 è stata utilizzata la metodologia immunoenzimatica IEMA applicata su sistema SR1 della ditta BIOCHEM. I dati sono stati elaborati utilizzando il software Dermalog che consente di valutare l'indice di rischio per la SD combinando i tre parametri ormonali, l'età materna e l'età ecografica⁽²⁾. Hanno aderito al programma di screening 200 gestanti di età compresa tra 19 e 42 anni. Utilizzando un cut-off di rischio di 1:300 sono risultate positive al test biochimico 4 donne che successivamente si sono sottoposte all'esame del cariotipo. In 2 casi la trisomia è stata confermata mentre negli altri 2 casi l'aberrazione cromosomica non è stata rivelata. Considerando l'età delle pazienti abbiamo potuto rilevare che le 2 donne con feto Down avevano un'età compresa tra 30 e 32 anni mentre i 2 falsi positivi avevano più di 35 anni. Questi dati suggeriscono che lo screening biochimico ha permesso di diagnosticare la SD in 2 donne con età a basso rischio che non si sarebbero sottoposte all'amniocentesi poiché l'esame è consigliato a donne di età superiore ai 35 anni. Nonostante l'esiguità dei casi da noi esaminati, ci sembra opportuno consigliare il TRI- test sia alle donne di età inferiore ai 35 anni e sia a quelle donne con più di 35 anni che sono poco disposte a sottoporsi all'amniocentesi, temendo il potenziale rischio d'aborto (1%) che tale esame comporta. Per quanto riguarda i 2 falsi positivi riteniamo che nel test sia stato influenzato soprattutto dall'età ad alto rischio delle gestanti.

1) Canick JA. Screening per la sindrome di Down mediante dosaggi di AFP, uE3 e HCG su siero materno. The Ligand Quarterly 1990;9;2:301-6

2) Crossley JA., et al. Prenatal Screening for chromosome abnormalities using maternal serum chorionic gonadotrophin, alpha-fetoprotein, and age. Prenatal Diagnosis 1991; 11: 83-101.