

---

**ABSTRACT POSTER**

---

## **Poster**

---

- 001 - 003 Analisi Decentrate
- 004 - 005 Applicazioni informatiche
- 006 - 008 Automazione e gestione del laboratorio
- 009 - 051 Biologia molecolare
- 052 - 063 Coagulazione
- 064 - 074 Controllo e gestione della qualità
- 075 - 082 Diabete
- 083 - 098 Ematologia
- 099 - 120 Endocrinologia
- 121 - 141 Farmacologia e tossicodipendenza
- 142 - 143 Tecniche separative
- 144 - 168 Immunologia, autoimmunità
- 169 - 177 Immunometria
- 178 - 183 Lipidi, lipoproteine
- 184 - 205 Marcatori cardiaci
- 206 - 217 Marcatori di neoplasia
- 218 - 219 Medicina dello sport
- 220 - 233 Proteine, enzimi
- 234 - 236 Proteomica clinica
- 237 - 262 Studi clinici
- 263 - 286 Valutazione di strumenti e prodotti
- 287 - 299 Varie

**001****PROGETTO DI GESTIONE DELLE ANALISI DECENTRATE (POCT) IN UN CENTRO TRAPIANTI**

Falliti G., Bellomonte D., Pitucco G., Manera B., Spatola R.

Laboratorio Analisi – Istituto Mediterraneo Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), Palermo

Introduzione. L'ISMETT è istituito nel 1996 come progetto di sperimentazione gestionale (art. 9 bis Ddl 502/1192), attraverso una partnership tra la Regione Siciliana, realizzata mediante le Aziende Ospedaliere Civico e Cervello di Palermo, e l'UPMC, University of Pittsburgh Medical Center. L'edificio, di 5 piani, è dotato di: 4 sale operatorie; 70 posti letto (44 in degenza ordinaria, 14 in terapia intensiva e 12 in sala risveglio); un reparto di radiologia interventistica; farmacia; laboratorio analisi e di anatomia patologica. Completamente informatizzato, il centro si avvale di tutte le più sofisticate attrezzature ed è costantemente collegato, attraverso linee dedicate, al Thomas Starzl Institute di Pittsburgh. Ogni stanza è dotata del sistema di cartella clinica elettronica. Metodi. Al fine di velocizzare ed ottimizzare la disponibilità di risultati di analisi di importanza critica per i pazienti in alcuni reparti, è stata configurata una rete (Sala Operatoria, Terapia Intensiva, Terapia Post Intensiva, Dialisi) di 4 strumenti per Emogas (POCT), IL GEM 3000, con un pannello di analisi più ampio, rendendo gli emogasanalizzatori dei piccoli laboratori on line con il Laboratorio centrale. Gli strumenti sono stati interfacciati tramite funzione web, IL GEMweb, con la rete aziendale consentendo al Laboratorio centrale di: a) visualizzare i display degli strumenti per eventuali situazioni di allarme; b) monitorare gli esami dei pazienti ed i Controlli di Qualità; c) essere on line per assistenza tecnica e consulenze. Gli strumenti, inoltre, sono stati interfacciati direttamente alla cartella elettronica (sistema HL7) dei pazienti per consentire l'inserimento diretto dei risultati analitici. Risultati. Sono stati eseguiti 30.000 prelievi per l'intero pannello analitico. I tempi di refertazione (TAT appropriato) di alcuni analiti (Glucosio, Lattato, Na K, Ca, Ht) sono stati, ovviamente, ridotti in maniera drammatica in talune situazioni fino al 90%. Non sono stati riscontrati errori postanalitici nella trascrizione dei dati. L'utilizzo dei Controlli di Qualità ha fornito una riduzione assoluta degli errori sistematici e casuali con un'affidabilità elevata rispetto ai dati ottenuti nel Laboratorio centrale. Lo strumento allocato in Dialisi è stato, altresì, utilizzato per il controllo dei bagni dialitici. Conclusioni. Il controllo diretto degli strumenti consente la verifica continua dei dati. E' stata riscontrata l'assenza quasi totale di errori pre-analitici. Si è ottenuto un contenimento dei costi in presidio ospedaliero monoblocco. Il pannello analitico "dimensionato" evita che gli strumenti vengano utilizzati come "laboratorio in miniatura" per parametri eseguibili in Laboratorio. Il personale infermieristico è stato completamente formato.

Bibliografia. 1) Pezzati P., et al., *Biochim.Clin.*, 28,532,2004 2) Carmignoto F., et al., *Biochimic.Clin.*, 28,563,2004

**002****VALUTAZIONE E CONTROLLO DELLA QUALITA' ANALITICA DEI GLUCOMETRI DI REPARTO DA PARTE DEL LABORATORIO.**

Marozzi R., Carusillo G.

A.O. Chiari - Laboratorio Analisi P.O. di Iseo (BS)

L'uso dei sistemi d'analisi Point of Care Testing (POCT) è sempre più frequente in ambito clinico. Il loro impiego risponde in particolare alle esigenze del clinico di avere risultati in tempi brevi, utili così alle esigenze diagnostiche e terapeutiche.

Tra i primi sistemi POCT introdotti si annoverano i glucometri. In genere il loro uso è delegato al personale infermieristico. Trattandosi comunque di sistemi analitici la loro implementazione necessita del coinvolgimento del laboratorio, che ha la competenza ed i mezzi per valutare la qualità del processo analitico.

Scopo del lavoro è stato quello di pianificare, attuare e gestire un sistema di controllo di qualità dei glucometri usati nei reparti del Presidio Ospedaliero di Iseo (BS), applicando conoscenze ed esperienze analoghe a quelle delle VEQ eseguite dal laboratorio. E' stata definita la metodologia per la preparazione dei campioni, la raccolta dei risultati e la loro elaborazione.

Fino ad oggi sono stati eseguiti: un ciclo completo di controlli, con tre invii di coppie di campioni di sangue intero, opportunamente preparati in laboratorio, ed il primo invio del secondo ciclo.

I risultati del 1° ciclo alle diverse concentrazioni medie ematiche di glucosio (n = 13) sono stati: 57,8 mg/dL CV 7,2 %, 82,1 mg/dL CV 7,2 %, 95,5 mg/dL CV 6,5 %, 126,3 mg/dL CV 5,6 %, 175,6 mg/dL CV 7,4 %, 225,0 mg/dL CV 18,7 %. Confrontando i valori mediani con i risultati ottenuti con lo strumento d'analisi (su plasma) del laboratorio (Integra 800 – Roche) si ottengono bias compresi tra -1,6 % e -7,1 %.

Il 2° ciclo è stato strutturato per l'invio di campioni anomali: anemici, poliglobulemi, iterici. Il primo invio, con campioni anemici (Hb 5,7 e 7,2 g/dL) ha fornito i seguenti risultati (n = 16): 111,0 mg/dL CV 4,1 %, bias +15,6%, 179,8 mg/dL CV 10,6 %, bias +11,7%.

All'elaborazione statistica dei risultati del 1° ciclo, è seguita una riunione con il personale direttivo infermieristico dei reparti, per illustrare dati e problemi d'uso dei POCT rilevati con il programma di controllo.

Sono state evidenziate difformità d'impiego dei POCT con conseguenti problemi d'accuratezza, dati statisticamente aberranti senza un'evidenza oggettiva del motivo, inaccuratezza strumento-dipendente.

Sono stati perciò raggiunti alcuni degli scopi del programma: rendere consapevoli gli operatori dei reparti delle caratteristiche di accuratezza e precisione dei POCT, della variabilità del risultato derivante dallo stato clinico del paziente, della necessità di addestramento all'uso e l'aver attivato un dialogo tra laboratorio e reparto con scambio di informazioni tecnico-applicative.

Rapi S., Fanelli A. Ruolo dei point of care nella gestione del diabete mellito. *Bioch Clin* 2004; 28:552-556.

**003****QUANTI OPERATORI UTILIZZANO STRUMENTI DI POINT OF CARE IN UNA AZIENDA OSPEDALIERA?**

Casati M., Bestetti G., Di Palma M., Perlangeli V., Pittalis S.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera S. Gerardo, Monza.

**Scopi/Obiettivi**

Il ricorso ad analisi di Point of Care (POCT) nei reparti ospedalieri è pratica sempre più diffusa. Le molteplici necessità di governo del POCT (valutazioni delle necessità cliniche, brevi tempi di risposta, vincoli di legge, qualità analoga al laboratorio centralizzato) ci hanno spinto a censire, non solo gli strumenti di POCT presenti nella Azienda Ospedaliera (A.O), ma anche il personale che esegue le analisi su questi strumenti.

**Metodologia**

Censimento mediante intervista al personale di reparto responsabile del POCT presso la nostra Azienda Ospedaliera (Aprile-Maggio 2005). Sono state censite due tipologie di strumenti POCT, secondo CLIA: classe 1) strumenti semplici e accurati "waived" (Esempio glucometri); classe 2) strumenti di media complessità (Esempio Emogasanalizzatori). E' stato quindi chiesto il numero di operatori abilitati alla processazione di campioni su tali strumenti, laddove presenti.

**Risultati**

Unità Operative e Ambulatori studiati: 58

Numeri complessivi di strumenti e di operatori abilitati

	Classe 1	Classe 2
Strumenti	84	7
Operatori abilitati	1109	271

Operatori abilitati su strumenti di Classe 2: dettaglio.

Reparti	I	M	P	T	Tot
T.I. Neurochir.	12	12		12	36
T.I. Cardiochir.	12	10			22
Sale Operatorie	6	20	15	20	61
Unità Coronarica	16				16
Sala Parto	10	20	12	5	47
T.I. Neonatale	37				37
Rianimazione	22	20		10	52
<b>Totali</b>	<b>115</b>	<b>82</b>	<b>27</b>	<b>47</b>	<b>271</b>

(I: infermieri, M: medici, P: personale tecnico, T: tirocinanti)

**Considerazioni conclusive**

Il censimento evidenzia un elevato numero di operatori abilitati ad eseguire analisi POCT (in media 13 e 38 per strumento, rispettivamente per la Classe 1 e 2). Considerata anche la criticità delle analisi eseguite in particolare su strumenti di classe 2 (emogasanalizzatori) risulta prioritario un governo dell'addestramento del personale interessato razionalizzando il numero di operatori e certificandone l'apprendimento.

**Riferimento bibliografico**

Plebani M. Il Point of Care Testing: una sfida alla pratica tradizionale del laboratorio clinico. *Biochimica Clinica* 28:523-31. 2004

**004****IL LABORATORIO IN TEMPO REALE**

Tomassini G., Antonini G., Ciardi L., Ferraro S., Francione S., Brustia A., Bellomo G.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale - Novara

*Scopo del lavoro:* Descrivere la nostra esperienza volta al collegamento in rete di tutte le Unità Operative che afferiscono al Laboratorio per rendere quest'ultimo efficace, ossia in grado di fornire prestazioni qualitativamente affidabili e in tempi brevi, ed efficiente, semplificando il rapporto tra struttura sanitaria ed utente, offrendo un servizio ottimale e di fiducia, utilizzando nel contempo in modo più razionale le risorse a disposizione.

*Materiali e metodi:* Il Laboratorio si è dotato di un sistema informatico, di strumentazione omogenea tra i settori routine ed urgenza ed ha implementato un sistema di gestione della qualità. Il sistema informatico di gestione del Laboratorio è costituito da 2 server, da 512Mb di memoria RAM e da un array di 6 dischi per macchina da 18 Gb di memoria di massa che gestiscono il programma LMX ed il database relazionale Oracle. Un terzo server da 364 Mb di memoria Ram e da 10 Gb di disco fisso, collegato in network ai primi due e con quello di gestione della cartella clinica dei reparti, gestisce il programma di collegamento con questi ultimi. Il programma del Pronto Soccorso invece è interfacciato con il nostro tramite un applicativo che esegue delle interrogazioni cadenzate tra i due sistemi. Il progetto, gestito da personale del Laboratorio e da quello del Servizio Informatica e Telematica, si è svolto in più riprese: divulgazione del progetto, preparazione di un manuale operativo pratico, preparazione di percorsi diagnostici e protocolli per ciascun reparto, corsi pratici per più giorni agli operatori sanitari presso ciascuna Unità Operativa fino all'addestramento completo di tutto il personale ivi operante.

*Risultati.* A distanza di 2 anni, dal primo reparto in rete con il Laboratorio, tutte le 95 U.O (reparti, Dh, sale operatorie e Pronto Soccorso) dell'Azienda Ospedaliera sono collegate con esso e visualizzano in tempo reale i risultati; sono state abolite le schede cartacee con le quali venivano richieste le analisi; viene eseguita la preaccettazione dei pazienti per gli ambulatori che gestiscono un grande numero di utenti. Tutti i campioni dei pazienti interni o preaccettati sono barcodati e ciascuna provetta all'arrivo in laboratorio viene identificata e presa in carico tramite Check-in.

*Discussione e conclusioni:* il Laboratorio non solo ha raggiunto gli obiettivi preposti: appropriatezza della richiesta di esami, riduzione del TAT, riduzione degli errori preanalitici, visualizzazione dei risultati in tempo reale, ecc.. ma i risvolti positivi nei confronti degli Utenti e dell'Azienda stessa hanno superato di gran lunga le nostre aspettative.

*Bibliografia:* Cappelletti P. La modernizzazione dei Laboratori orientata all'appropriatezza diagnostica e all'efficacia dei trattamenti, *Riv Med Lab - JML* 2004;2:147-63.

**005****CAMPIONI PER ESAMI URGENTI E TRASPORTO PNEUMATICO**

Frezzotti A., Solenghi M.D., Finaurini L., Tocchini M. Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I - Lancisi - Salesi - Ancona

Allo scopo di ridurre il tempo tra la raccolta del campione biologico e l'accettazione dello stesso in laboratorio è stato attivato da circa otto mesi un sistema di trasporto pneumatico soprattutto per l'invio dei campioni urgenti; il Laboratorio Analisi esegue circa 3.200.000 esami all'anno di cui il 30% urgenti.

**Materiali e metodi** Il sistema pneumatico di trasporto (Tecnopost S.p.A.) si sviluppa con una linea di tubazione di circa 2000m e collega 10 stazioni di cui le 2 più lontane distano dalla postazione Urgenze del Laboratorio circa 500m; i reparti collegati sono Pronto Soccorso, Medicina d'Urgenza, 3 Rianimazioni, Unità Coronaria e le sezioni di Laboratorio sono Urgenze, Accettazione, Microbiologia, Virologia. Il sistema di trasporto utilizza bossoli a chiusura stagna con transponder integrato per il riconoscimento automatico della stazione di provenienza; i bossoli viaggiano nell'inoltro alla velocità lineare di 3m/sec con decelerazione controllata prima dell'arrivo a destinazione e nel ritorno a 10m/sec. I campioni inviati sono per esame emocromocitometrico, esami coagulativi e biochimici. E' stata valutata la performance del sistema di trasporto pneumatico: è stato calcolato il numero medio di invii ed il tempo medio impiegato per l'inoltro dei campioni alla stazione Urgenze analizzando i dati di 2 settimane. Per sei mesi limitatamente ai campioni provenienti dal Pronto Soccorso è stato registrato il numero di esami non eseguiti per presenza di emolisi ed i dati sono stati confrontati con quelli rilevati nei sei mesi precedenti l'istallazione del sistema di trasporto pneumatico. Sono stati inoltre registrati i blocchi delle stazioni e/o dell'intero sistema.

**Risultati** Nel periodo di osservazione sono stati effettuati ogni giorno in media 85 invii verso la postazione Urgenze del Laboratorio di cui 60 provenienti dal Pronto Soccorso. E' stato registrato un tempo medio di trasporto di 1' 35'', comprensivo del tempo di attesa; la maggiore frequenza di invii si è osservata tra le ore 10 e 12 con il 7% e tra le ore 15 e 17 con il 6% degli invii. Il numero di esami non eseguiti per emolisi è stato dell'8% rispetto al 7,8% registrato nei sei mesi precedenti l'uso del trasporto pneumatico. Dal momento dell'istallazione sono stati registrati 2 blocchi del sistema che hanno comportato l'intervento tecnico della ditta fornitrice e 3 blocchi di una singola stazione che si sono risolti con l'intervento degli operatori del laboratorio

**Conclusioni** Il vantaggio maggiore è rappresentato dalla velocità con cui i campioni giungono in laboratorio. Il sistema è stato ben accettato da tutte le unità operative per la semplicità di uso e perché ha consentito un migliore utilizzo del personale ausiliario liberato dai lunghi tragitti per consegnare i campioni. Il numero di blocchi è risultato accettabile, considerando anche che essi si sono verificati nel primo periodo di impiego. L'emolisi rilevata sui campioni non è attribuibile al sistema di trasporto.

Keshgegian AA, BullGE Evaluation of a soft-handling computerized pneumatic tube specimen delivery system. Effects on analytical results and turnaround time.

**006****ESAMI URGENTI, MIGLIORAMENTO DEL TAT**

Frezzotti A., Solenghi M.D., D'Anzeo M., Tocchini M. Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I - Lancisi - Salesi - Ancona

Per ottimizzare il TAT (turnaround time) degli esami urgenti sono state implementate nuove tecnologie nella fase pre-analitica (trasporto pneumatico) e post-analitica (consultazione a video dei referti).

**Materiali e metodi** Le unità operative da cui proviene il maggior numero di richieste urgenti sono state collegate al Laboratorio con un sistema di trasporto pneumatico per i campioni ed un computer dedicato gestisce tutti i dati. Il programma gestionale del laboratorio permette a tutte le unità operative la consultazione a video in tempo reale dei referti validati; lo stesso programma registra l'ora di accettazione dei campioni e l'ora di acquisizione dei risultati. Sono stati rielaborati i dati relativi agli esami urgenti: Hb, K, PT, Trop I provenienti da tutte le unità operative ed in particolare dal PS (Pronto Soccorso). Sui dati di 5 giorni (lunedì-venerdì) è stato calcolato il TAT medio (tempo impiegato dal trasporto pneumatico e tempo tra accettazione del campione e disponibilità dei risultati a video); inoltre è stato calcolato il TAT per il quale sono disponibili il 50% e il 90% dei risultati.

**Risultati** La frequenza media giornaliera degli esami urgenti è stata di 192 Hb, 161 K, 145 PT, 74 Trop I, di cui 52 Hb, 44 K, 29 PT e 17 Trop I provenienti dal PS, con il massimo nelle prime ore del mattino. Il TAT medio per Hb è stato di 29', con il 50% dei referti a meno di 11' ed il 90% entro 55'; per il PS il TAT medio per Hb è stato di 9', con il 50% dei referti a meno di 6' ed il 90% entro 15'. Il TAT medio per K è stato di 55', con il 50% dei referti a meno di 48' ed il 90% entro 86'; per il PS il TAT medio per K è stato di 36', con il 50% dei referti a meno di 34' ed il 90% entro 49'. Il TAT medio per PT è stato di 50', con il 50% dei referti a meno di 41' ed il 90% entro 75'; per il PS il TAT medio per PT è stato di 37', con il 50% dei referti a meno di 34' ed il 90% entro 48'. Il TAT medio per Trop I è stato di 61', con il 50% dei referti a meno di 51' ed il 90% entro 98'; per il PS il TAT medio per Trop I è stato di 49', con il 50% dei referti a meno di 45' ed il 90% entro 64'. I TAT più lunghi riportati sono stati 56' per Hb, 96' per K, 67' per PT, 75' per Trop I, fra le ore 8 e le ore 9, quando giunge circa il 35% di tutte le richieste urgenti; i TAT più lunghi per i campioni del PS sono stati 16' per Hb, 47' per K, 51' per PT, 61' per Trop I

**Conclusioni** Il trasporto pneumatico ha abbattendo notevolmente il tempo di invio dei campioni e la registrazione computerizzata riducendo i tempi di accesso ai referti hanno ottimizzato tutto il processo analitico. I valori del TAT del PS sono migliori rispetto a quelli generali sui quali pesa l'elevato numero di richieste per il monitoraggio dei pazienti critici.

Howanitz PJ, Steindel SJ, Cembrowski GS, Long TA Emergency department stat test turnaround times. A college of American Pathologists' Q-Probes study for potassium and hemoglobin Arch Path Lab Med 1992; 116:122-8

**007****IL SISTEMA ABBOTT-LINK PERMETTE IL MONITORAGGIO CONTINUO ON-LINE DELLE PRESTAZIONI METRICHE STRUMENTALI**

Longhi E., Dolci A., M.Barberis.  
Dipartimento di Patologia MultiMedica, via Fantoli  
16/15, 20138 Milano

Introduzione: tutti i sistemi di laboratorio registrano un enorme quantità di informazioni potenzialmente utili per migliorare le loro prestazioni, la qualità e l'economicità dei dosaggi. Acquisire, elaborare e valutare tutti questi dati rappresenta per il management di laboratorio un ambizioso traguardo gestionale. Scopo del lavoro: valutare il sistema AbbottLink, interconnessione attiva, on line, in continuo 24 ore al giorno, via Internet con il server centrale di Abbott Diagnostics, che trasmette e riceve informazioni in tempo reale di dati strumentali, system log files di calibrazione, controllo di qualità e dosaggi, records di manutenzione, segnali di errore. Metodologia: gli analizzatori Abbott presenti nel nostro laboratorio (2 Aeroset, 2 AxSYM Plus, 1 Architect i4000, 1 Architect Ci8200) sono stati simultaneamente collegati ad un PC dedicato (AbbottLink PC), che trasmette via Internet al Data Center di AbbottLink in forma criptata e protetta tutti i dati. I dati raccolti sono visibili in tempo reale sul sito Internet di AbbottLink dall'utente che può gestirne l'elaborazione statistica anche in forma grafica. Risultati: in 5 mesi di sperimentazione del sistema (febbraio-giugno 2005) sono stati registrati circa 1800 contatti al giorno per strumento collegato senza registrare alcun problema di trasmissione né di malfunzionamento degli strumenti. Accedendo via Internet al sito di AbbottLink da qualunque computer, anche esterno al Laboratorio, abbiamo raccolto in tempo reale informazioni relative allo stato degli strumenti e alle loro prestazioni. Dai "system log-files" i tecnici di Abbott Diagnostics hanno ricavato informazioni utili a identificare precocemente o, in alcuni casi, prevenire differenti tipologie di problemi strumentali. Dall'elaborazione statistica personalizzata dei dati, abbiamo ottenuto il conteggio esatto dei test eseguiti su ogni strumento compresi i reruns, i controlli e le calibrazioni, e le tabelle derivate di utilizzazione dello strumento e di efficienza di ogni test, utilizzate per valutazioni economiche dei sistemi in uso. I reports, aggiornati in tempo reale delle manutenzioni ordinarie effettuate, sono stati introdotti come elemento documentale del Sistema di gestione della qualità del nostro laboratorio. Conclusioni: AbbottLink realizza un modello operativo di controllo totale on-line via Internet dei sistemi analitici raggiungendo alcuni obiettivi critici per l'operatività del laboratorio quali la manutenzione preventiva, la gestione condivisa con l'utilizzatore dei sistemi installati, la verifica di strumenti e reagenti su larga scala e soprattutto la disponibilità all'utilizzatore dei dati di operatività degli analizzatori. Bibliografia: Williams WB et al "Remote Access to Instrument Operational Data in Real-Time" Clin Chem 2004; 49(S): B-25.

**008****ATTUALITA' IN LAB-AUTOMATION E RICADUTE ORGANIZZATIVE: IL MODELLO DESENZANO DEL GARDA**

Tani M., Cocchi G., Pedroni P., Milanese B.  
Servizio di Patologia Clinica  
A.O. "Desenzano del Garda"  
Direttore Prof. B. Milanese

La Direzione dei Laboratori Aziendali (Presidi Ospedalieri di Desenzano/Lonato, Gavardo/Salò, Manerbio/Leno), ha indirizzato i propri sforzi al miglioramento della "Qualità Totale della Organizzazione di Laboratorio", prendendo in considerazione i seguenti parametri:

- Error Rate, •Controllo del processo, •Tracciabilità, •Rintracciabilità, •TAT (Turn Around Time), •TTFR (Time To First Result), •Numero di tubi primari, •Gestione dello stoccaggio, •Sicurezza degli operatori, • rapporto numero di test/ FTE (Full Time Equivalent).

Sono stati utilizzati i seguenti strumenti operativi:

•**Implementazione del LIS** con:

- Utilizzo del codice a barre, •Interfacciamento degli analizzatori, •Collegamento in rete con punti prelievo e presidi esterni •Collegamento con i reparti (accettazione e refertazione), •Utilizzo dell'ID campione, •Gestione del Check In, •Tracciabilità e rintracciabilità dei campioni, •Software di autovalutazione, • Delta-check in linea, • Continuous Patient Reporting.

•**Consolidamento della fase analitica:** attuato sia attraverso l'accorpamento in un'unica strumentazione degli esami di chimica-clinica, sia attraverso il collegamento con una catena omogenea delle strumentazioni del settore di immunometria (ormoni, markers tumorali, allergologia e sierologia infettiva).

•**Automazione delle Fasi Pre/Post analitica con:**

- Check in, •Sorting, •Aliquoting, •Decapping, •Storage, •Retrieval.

**Miglioramento ottenuto.**

Non esistendo ad oggi parametri oggettivi per la determinazione della Qualità Organizzativa di un Laboratorio di Patologia Clinica, il progetto è stato valutato utilizzando "il controllo di gestione", che ha confrontato:

- il conto economico, •i ricavi ed i costi di produzione, •gli indicatori di assorbimento di risorse, •gli indicatori qualitativi di efficienza economica.

Il reale miglioramento della qualità attuale si riscontra con l'aumento della produzione relativa ai pazienti ambulatoriali, il contenimento dei costi diretti ed il conseguente miglioramento degli utili.

**Miglioramento futuro**

Attuazione di una metodologia valutativa che determini la "Qualità Organizzativa" attraverso l'applicazione della Balanced Score Card (BSC), i cui principi ispiratori sono: centralità del paziente, efficacia ed appropriatezza, efficienza gestionale.

Bibliografia

Balanced Score Card in sanità

E. Vignati & P. Bruno, Franco Angeli 2004

**009****4 ANNI DI FOLLOW-UP IN DONNE CON PAP-TEST ALTERATO: CORRELAZIONE FRA CEPPI HR-HPV E DIAGNOSI CITO-ISTOLOGICA**

Bianchi L., Venturi C., Albertacci A., Apicella P.  
Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3  
Pistoia, Zona della Val di Nievole, Via Cesare  
Battisti 2, 51017 Pescia (PT).

Il carcinoma squamoso della cervice e le lesioni che lo precedono sono inequivocabilmente correlate all'infezione da parte di ceppi HPV ad alto rischio oncogeno (HR-HPV:16, 18, 31, 33). Rimane invece ancora da chiarire quale sia il rischio oncogeno dei vari ceppi in tale patologia (1).

**Obiettivi.** Scopi di questo studio sono stati:

1) correlare i ceppi di HPV ad alto rischio oncogeno con la gravità delle lesioni intraepiteliali rilevate al pap test e all'esame istologico della biopsia della cervice; 2) valutare la prevalenza e il valore prognostico dei genotipi presenti nelle lesioni di basso e di alto grado.

**Metodologia.** In una popolazione di 970 donne di età compresa tra i 15 e gli 81 anni (febbraio 2001-aprile 2005) con lesioni di basso e alto grado (LSIL o HSIL) o anomalie squamose di incerto significato (ASCUS) al pap test è stato ricercato l'agente virale HPV da prelievo endocervicale utilizzando la reazione a catena della polimerasi (PCR) con primers specifici per la regione L1 e della regione E6-e E7.

**Risultati.** Gli HR-HPV rappresentano il 71% di ASCUS (78/110), il 62% di LSIL (298/481) ed il 98% di HSIL (61/62), positivi alla ricerca del virus. Tutti gli HSIL presentavano HR-HPV ed i genotipi più frequenti erano HPV 16 (28/61), HPV 18 (14/61) e HPV 31 (6/61). Su 79 displasie gravi (coinfezioni 13) 78 presentavano HR-HPV con prevalenza degli stessi genotipi riscontrati negli HSIL. I 5 casi di carcinoma in situ erano HR-HPV positivi e l'HPV 16 (3/5 con due confezioni) era il genotipo più frequente.

**Conclusioni.** 1) Si conferma la forte correlazione fra HR-HPV e lesioni precancerose e cancerose cito-istologiche con prevalenza dei genotipi HPV 16, 18 e 31; 2) risulta evidente come tali genotipi, essendo presenti in percentuale maggiore nelle lesioni di alto grado abbiano un valore prognostico maggiore.

**Bibliografia.** Munoz N., Bosch FX., De Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah KV, Snijders PJ., Meijer. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.

**010****DIAGNOSI MOLECOLARE DI MUTAZIONI RARE A CARICO DEL GENE HFE**

Stecchina M., Bertolissi M., Olivieri M., Catapano R.  
SIT ASS N° 2 Isontina – P.O. GORIZIA

**Scopo** dello studio è stato quello di determinare la frequenza delle mutazioni rare a carico del gene HFE in una popolazione di soggetti con sovraccarico di ferro o con storia familiare di emocromatosi ereditaria (HH) precedentemente testati per le mutazioni C282Y e H63D.

**Materiali e metodi.** Sono stati riesaminati i campioni di sangue intero congelato a -70°C di 77 soggetti

( 58 maschi di età tra i 28 e 75 anni e 19 femmine di età compresa tra 2 e 78 anni) in precedenza testati per la mutazione C282Y e H63D con metodica PCR/ibridazione in micropiastra. (Nuclear Laser Med.)

La ricerca di mutazioni rare è stata eseguita mediante metodica multiplex PCR/Ibridazione inversa su striscia (VIENNALAB/Nuclear Laser Med) in grado di evidenziare 12 mutazioni del gene HFE:V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, P160delC, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P.

**Risultati:** la prima metodica aveva evidenziato la presenza di mutazioni in 28/77 soggetti (36%) di cui: 5 portatori omozigoti e 3 eterozigoti per la mutazione C282Y; 2 portatori omozigoti e 16 eterozigoti per la mutazione H63D ed infine 2 portatori di doppia mutazione eterozigote C282Y/H63D. Il nuovo test ha riconfermato i precedenti risultati positivi per la ricerca delle mutazioni C282Y e H63D. Nei 49 pazienti negativi con il primo metodo sono stati identificati 4 portatori eterozigoti per la mutazione S65C pari al 5% (4/77); nei 28 pazienti risultati positivi con il primo metodo 1 soggetto, portatore eterozigote per la mutazione H63D è risultato anche portatore eterozigote per la mutazione E168Q, pari all'1,3% (1/77).

**Conclusioni:** i nostri dati dimostrano l'affidabilità della tecnologia di ibridazione inversa su striscia per fornire una rapida, completa e sicura analisi delle mutazioni multiple del gene HFE. Sebbene la numerosità del campione non sia molto elevata il riscontro in 5 soggetti (6.5% del campione) di una mutazione rara inducono a valutare l'opportunità di introdurre la ricerca a 12 mutazioni nello screening per emocromatosi.

**Bibliografia:** Kotze MJ et al. Molecular diagnosis of hereditary Hemochromatosis : Application of a newly-developed reverse-hybridization assay in South African population. *Clin.Genet.* 2004 ; 65 (4):317-21  
Altes A. et al. Prevalence of C262Y, H63D, S65C mutations of the HFE gene in 1.146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet Test.* 2004 Winter; 8(4):407-10

**011****CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI SOGGETTI AFFETTI DA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA (CMI) MEDIANTE IMPIEGO DI UN MICROCHIP ELETTRONICO**

Cetica V.<sup>1</sup>; Bernabini S.<sup>1</sup>; Giuliani C.<sup>1</sup>; Girolami F.<sup>1</sup>; Marseglia G.<sup>1</sup>; Hihn B.<sup>2</sup>; Guardione D.<sup>3</sup>; Torricelli F.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>SOD Diagnostica Genetica AOU Careggi Firenze  
<sup>2</sup>Nanogen Europe BV  
<sup>3</sup>Biochips Nanogen Amplimedical S.p.A.

La tecnologia Nanogen si distingue dalle altre tecnologie microarray per l'impiego del campo elettrico per il trasporto del DNA ai siti testo del chip (pad). Tale tecnologia risulta estremamente accurata e versatile poiché ogni sito testo presenta una connessione elettronica individuale con il resto del sistema (NanoChip Molecular Biology Workstation) e lavora indipendentemente dagli altri.

La Nanogen trova applicazione sia in ambito diagnostico che di ricerca poiché indicata per lo studio su larga scala di mutazioni e SNP noti; nonostante il NanoChip appartenga alla categoria dei chip a "bassa densità" (100 pad), ottimizzando il protocollo sperimentale è possibile studiare sullo stesso pad più variazioni genetiche, aumentando così il numero di caratterizzazioni per chip.

Presso la SOD Diagnostica Genetica AOU Careggi è stato realizzato un NanoChip per la detection di 13 mutazioni relative ai geni sarcomerici *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* coinvolte nell'insorgenza della Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI). Le mutazioni oggetto di studio sono state selezionate avvalendosi dei dati riportati in letteratura e dell'esperienza maturata dal nostro gruppo di lavoro impegnato nella diagnosi genetica di CMI da diversi anni.

Per ciascuna mutazione è stato disegnato un opportuno set di sonde costituito da un "discriminator wt" specifico per l'allele wild-type, un "discriminator mut" specifico per l'allele mutato ed uno "stabilizzatore". L'identificazione delle mutazioni di interesse prevede l'impiego di due reporter universali, oligonucleotidi di 18 basi marcati all'estremità 3' con un fluorocromo: Cy3 per l'universal reporter complementare al discriminator wild-type, Cy5 per quello complementare al discriminator mutato.

I 13 protocolli per la detection delle mutazioni in studio sono stati ottimizzati individuando le opportune stringenze termica e chimica che consentono di distinguere le sonde con perfetto match da quelle con mismatch.

La validazione della metodica è stata eseguita su 98 pazienti CMI precedentemente caratterizzati mediante metodi "gold-standard" (DHPLC, sequenziamento in automatico), realizzando un totale di 1274 caratterizzazioni genetiche ed ottenendo una concordanza del 100% indipendentemente dal tipo di mutazione studiata e dal genotipo dei pazienti.

**012****CHEMOKINE RECEPTORS POLYMORPHISMS AND AORTA ABDOMINAL ANEURYSM: TH1/TH2 MEDIATED RESPONSES.**

Barassi A.<sup>a</sup>, Ghilardi G.<sup>c</sup>, Turri O.<sup>b</sup>, Erario M.<sup>b</sup>, Battaglioli L.<sup>b</sup>, La Torre A.<sup>b</sup>, Melzi d'Eril GV<sup>c</sup>, Biondi ML.<sup>b</sup>  
<sup>a</sup>DSBSC, Università degli Studi dell'Insubria, Varese; <sup>b</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Az Ospedaliera San Paolo, Milano; <sup>c</sup>Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano.

**Introduction.** Abdominal aortic aneurysm (AAA) occur in 3% of individuals over the age of 60. The prevalence of AAA will increase as the population ages and thus will continue to entail considerable morbidity, mortality, and medical expense. T lymphocytes localize within lesions of two diametrically opposed expressions of atherosclerosis: stenosis-producing plaques and ectasia-producing AAA. T<sub>H</sub>1 immune responses appear to predominate in human stenotic lesions; on the contrary, Schonbeck demonstrated that AAA predominantly expresses T<sub>H</sub>2-associated cytokines and correspondingly lack mediators associated with the T<sub>H</sub>1 response. During the T cell differentiation process, Th1 cells acquire the capacity to produce IFN- $\gamma$  and expression of chemokine receptors such as CCR5, CXCR3, and CCR2. Conversely, developing Th2 cells acquire the capacity to produce IL-4 and express CCR3, CCR4, CCR8. Certain allelic variants of chemokine receptor gene are associated with higher or lower expression of receptors. **Aim.** The aim of this study was to compare CCR5, CCR2 and CXCR3 genotypes between patient with AAA and patients with occlusive diseases [patients with occlusive atherosclerotic disease (PAOD) and internal carotid artery stenosis (CS)]. **Material and methods.** In this study we examined 77 AAA patients (11F/66M, age 71 $\pm$ 6y), 76 PAOD patients (18F/58M, age 68 $\pm$ 9y), 62 CS patients (28F/34M, age 69 $\pm$ 8y), and 90 control subjects (30F/60M, age 68 $\pm$ 7y). DNA was extracted from whole blood and PCR reaction was carried out with specific primers. Polymorphism was detected with appropriate techniques.

**Results.** Our results indicate that the frequency of CCR5 and CCR2 mutant genotypes was significantly higher in patients with AAA than in controls [p < 0.04 and OR (CI, 95%) 2.22 (0.96-5.24); p < 0.003 and OR (CI, 95%) 3.25 (1.38-7.95), respectively]. CCR5 frequency and V249I genotype on CXCR3 gene were statistically different between AAA and obstructive patients [p < 0.014 and OR (CI, 95%) 2.51 (1.11-5.79)] and [p < 0.02 and OR (CI, 95%) 2.01 (1.06-3.81)], respectively. **Discussion.** Our data indicate that CCR5, CCR2 and CX3CR1 gene polymorphisms are significantly and independently associated with atherosclerotic AAA evolution.

**Bibliography:** Schonbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. Am J Pathol 2002;161(2):499-506.

**013****EFFETTI DEL POLIMORFISMO eNOS 4b/4a SUL RISCHIO DI INFARTO MIOCARDICO ACUTO IN UN CAMPIONE DI GIOVANI SARDI**

§Musino L., §Rossi R., °Partenza A., Chessa R., ^Pilo P., ^ Mureddu G., ^Maoddi I. , §Carru C., §Deiana L.

§Dip. Scienze Biomediche -Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari; °Unità Cardiologica "Zonchello", ASL n°3 Nuoro; ^UTIC, ASL n.3 Nuoro

Sebbene il ruolo dei fattori ambientali sul rischio di patologie coronariche cardiache (CHD) sia stato ampiamente dimostrato, specialmente in pazienti giovani, i geni maggiormente coinvolti nell'insorgenza di CHD e di infarto miocardico acuto (AMI) devono ancora essere identificati.

L'ossido nitrico (NO) è un importante fattore di rilascio endoteliale la cui sintesi è catalizzata da tre isoforme dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS). L'isoforma eNOS, espressa principalmente nell'endotelio, sintetizza l' NO che penetra nelle cellule muscolari lisce vasali e contribuisce al mantenimento del tono vascolare; l'NO inibisce inoltre l' aggregazione piastrinica e l'adesione delle piastrine e dei leucociti all'endotelio vascolare. Mutazioni nel gene eNOS e la conseguente alterazione nella produzione dell'NO potrebbero contribuire ad incrementare la predisposizione alle coronaropatie.

Nel nostro studio abbiamo valutato il contributo del polimorfismo intronico Ins/Del (4b/4a) di 27 bp nel gene eNOS sul rischio di IMA giovanile. Il polimorfismo in esame è stato recentemente associato con alterati livelli plasmatici di NO e sembra essere responsabile delle variazioni plasmatiche dei livelli di nitriti e nitrati.

**Pazienti e metodi.** Lo studio caso-controllo comprendeva 71 giovani infartuati della provincia di Nuoro (M= 61, F= 10; età media  $45,2 \pm 4,2$ ) e 135 soggetti di controllo reclutati in maniera *random* nella popolazione sarda.

L'identificazione genotipica del polimorfismo oggetto di questo studio è stata effettuata mediante PCR seguita da elettroforesi in gel di agaroso (1). Per comparare le distribuzioni genotipiche e alleliche abbiamo utilizzato il test del chi quadrato.

**Risultati.** L'analisi del polimorfismo eNOS 4b/4a ha evidenziato una prevalenza dell'allele Del nel 7,04 % dei casi rispetto al 15,9% dei controlli con una differenza statisticamente significativa:  $P= 0,016$ ,  $OR= 2,50$  (1,22-5,14). Il genotipo omozigote DD, era assente nei soggetti con IMA e presente nel 3,7% dei controlli.

**Conclusioni.** Nel nostro studio la maggiore incidenza di individui omozigoti DD osservata nei controlli rispetto al gruppo dei pazienti sembra evidenziare un effetto protettivo dell'allele Del nei confronti dell'insorgenza di IMA giovanile. Tuttavia tale osservazione potrà essere confermata solo dall'analisi su un campione più ampio allo scopo di poter apprezzare anche eventuali differenze tra i sessi.

Tempfer C., Hum. Reprod., **16** (8): 1644-1647; 2001

**014****IDENTIFICATION BY DHPLC OF NOVEL MUTATIONS IN THE ABCR GENE ASSOCIATED WITH STARGARDT DISEASE IN THE ITALIAN PATIENTS**

Passerini I<sup>^</sup>; Girolami F<sup>^</sup>; Sodi A<sup>°</sup>; Mariottini A<sup>^</sup>; Menchini U<sup>°</sup>; Torricelli F<sup>^</sup>

° Eye Clinic, University of Florence, Italy  
^SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Florence, Italy

**Purpose:** Stargardt disease (STGD) is a progressive juvenile-to-young adult-onset macular degeneration with severe reduction of central visual acuity and normal peripheral vision. Mutations in ABCR gene are responsible for autosomal recessive Stargardt disease (arSTGD). In this study we determined the mutation spectrum in ABCR gene in a group of Italian patients with arSTGD.

**Methods:** Thirty nine families from central Italy, some members of which were affected by arSTGD, were clinically examined. DNA samples were analyzed for mutations in all 50 exons of the ABCR gene by DHPLC approach and direct sequencing techniques.

**Results:** All the affected subjects showed bilateral central vision loss with macular atrophy and yellow-white flecks at the posterior pole, typical dark choroid in fluorescein angiography, normal electroretinogram, normal caliber of retinal vessels, no pigmented bone spicules in the retinal periphery. In all these patients we reported some mutations of ABCR gene. Some of these mutations have been already described and among them G1961E was the most frequent in our series. Fifteen novel mutations were identified: nine missense mutations (N96K, N415K, M840R, T970P, F1015I, G1078E, P1484S, L2140Q and L2221P); two nonsense mutations (Q21X and W1479X); three small deletions (5109delG, 5903delG and 6750delA) and one gross insertion (4021ins24bp). These mutations were not detected in 150 unaffected control individuals (300 chromosomes) of Italian origin.

**Conclusions:** Some novel mutations in ABCR gene in STGD patients were reported. These data confirm the extensive allelic heterogeneity of the ABCR gene, in agreement with previous observations in patients with Stargardt disease from Italy.

**015****CARCINOGENETIC POTENTIAL OF THE WSR CAGA REGION OF HELICOBACTER PYLORI.**

Stranges A.; Basso D.; Zambon C.-F.\*; Falda A.; Fasolo M.; Del Giudice L.#; Guariso G.#; Belluco C.^; Di Mario F.°; Navaglia F.; Greco E.; Fogar P.\*; Rugge M.§; Basso G.#; Plebani M.

Departments of Laboratory Medicine, \*Medical and Surgical Sciences, #Pediatrics, ^Oncological and Surgical Sciences and §Pathology, University of Padova; °Department of Gastroenterology, University of Parma; Italy.

Within CagA a different number of repeats of the EPIYA, the tyrosine phosphorylation site, might be found. Higher phosphorylated CagA is suggested to worse H. pylori infection outcome. The aim of this study was to ascertain whether a different number of the first (FR) or of the second (WSR) repeat region of the cagA gene, encompassing the sequence encoding for the EPIYAs, correlates with inflammation and outcome of cagA positive H. pylori infections. We studied cagA positive Italian patients with antral (n=18) or diffuse (n=16) gastritis, with duodenal ulcer (n=16) or with non-cardia gastric cancer (NCGC, n=25). The number of repeats in FR and WSR regions were PCR analysed from antral isolates. In a subset of 28 isolates, 14 from NCGC, the whole 3' cagA region was sequenced. In all patients the FR region contained one repeat. The WSR repeats ranged from 0 to 3. Twenty-two patients were coinfecting by strains with a different number of WSR repeats. H. pylori strains with less than 2 WSR repeats had a more severe corpus activity ( $X^2=13.74$ ,  $p<0.005$ ). NCGC was correlated with H. pylori strains with two or more WSR repeats, while those with less than two repeats were correlated with duodenal ulcer ( $X^2=12.45$ ,  $p<0.05$ ). Although differences in nucleotide sequence of the 3' cagA region were found, none was associated with disease diagnosis or inflammatory degree. In conclusion in Italian patients cagA positive infections with less than two WSR repeats are correlated with duodenal ulcer, those with two or more repeats with NCGC.

M. Hatakeyama. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nature Reviews Cancer 2004;4:688-694.

**016****POLIMORFISMO DELLA FRACTALKINA, SCLERODERMIA E IPERTENSIONE POLMONARE**

Erario M., Turri O., Pateri F., Battaglioli L, LaTorre A, Marasini B.\* Melzi d' Eril GV., Biondi MI. Laboratorio Analisi Chimico cliniche Az Ospedaliera San Paolo, Milano. \* Dip di Med, Chir e Odont, Università degli Studi di Milano

La sclerodermia (Systemic Sclerosis, SSc) è una malattia autoimmune di origine complessa caratterizzata da modificazioni del microcircolo e, in particolare, da progressiva fibrosi sia cutanea che degli organi interni. Recentemente, si è data importanza al ruolo dell'endotelio, dell'infiammazione e dell'adesione leucocitaria come primo passaggio nelle lesioni sclerodermiche, in particolare nell'ipertensione polmonare (PAH), complicanza spesso mortale della SSc. La Fractalkina (FKN) è una chemochina che agisce sul recettore CX3CR1 e media l'adesione leucocitaria e la risposta immunitaria. La sua concentrazione nel plasma è aumentata nei pazienti affetti da SSc, in particolare in quelli con PAH. Due polimorfismi di CX3CR1 (V249I e T280M) sono stati associati ad una significativa riduzione del rischio di aterosclerosi, dovuta ad una diminuita adesione leucocitaria. Per valutare la componente genetica del ruolo della FKN nella SSc e, in particolare del PAH, abbiamo studiato 76 pazienti (età 63+/-11) affetti da SSc limitata e 204 controlli. Nei pazienti è stata valutata la pressione polmonare e il valore soglia per la diagnosi di PAH è stato stabilito a >35 mm. Il DNA è stato estratto da sangue intero, la regione interessata è stata prima amplificata e successivamente sottoposta a sequenziamento diretto (Abi Prism 310- Perkin Elmer/Applied Biosystem) con primers specifici.

L'equilibrio di Hardy-Weimberg è rispettato solamente nella popolazione di controllo, in quanto, per entrambi i polimorfismi, si è osservato un significativo scostamento nella distribuzione (un eccesso di I/I  $p=0.002$  e di M/M  $p=0.018$ ). Il genotipo I/I è significativamente più frequente nei pazienti con SSc rispetto ai controlli (OR 3.3 (95%CI; 1.30-8.32;  $p=0.0034$ ) e differenza anche i pazienti con ipertensione polmonare (OR 4 (95% CI ;0.97-17.43;  $p=0.022$ ). La frequenza dell'allele M è significativamente maggiore nei pazienti con ipertensione polmonare (0 vs 15%, OR 7.37 (95%CI 2.45-24.6;  $p=0.0001$ ). Se si considera la combinazione genotipica si osserva che l'associazione dei genotipi I/I e M/M è significativamente più alta nei pazienti ( $p=0.027$ ).

Dai nostri risultati si possono trarre le seguenti conclusioni: 1) entrambi i polimorfismi di CX3CR1 (sia separatamente che in associazione) sono coinvolti nella patogenesi della SSc 2) anche la PAH sembrerebbe essere influenzata da questi polimorfismi 3) la FKN e il suo recettore potrebbero essere un target importante per nuovi indirizzi terapeutici.

**017****GENETIC POLYMORPHISMS ROLE IN THE RESPONSE TO HMG-COA REDUCTASE THERAPY.**

Palmi I.<sup>1</sup>, Zuccaro P.<sup>1</sup>, Pacifici R.<sup>1</sup>, Mombelli G.<sup>2</sup>, Sirtori CR.<sup>2</sup>

1 Department of Drug Research and Evaluation, Italian National Institute of Health, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma, Italy

2 Center E. Grossi Paoletti, Department of Pharmacological Sciences, University of Milano, Via Balzaretti 9, 20133 Milano, Italy

Statins (HMG-CoA reductase) are among the most widely used drugs and are generally rated as safe. However, up to 20% of treated patients describe muscle symptoms during statin therapy, mainly cramps and stiffness, at times requiring analgesic treatment or leading to drug withdrawal (1). Moreover therapeutic efficacy (lipid lowering effectiveness) is debated to be dependent from the implication of cytochrome P450 CYP2D6 isoenzyme in drug metabolism. In order to fully evaluate the influence of genetic background to drug efficacy and tolerability, 50 patients with well documented muscular side effects (mainly of a subjective nature) were recruited and compared to 52 patients with a similar age and sex distribution but presenting no side effects. The study protocol was approved by the Hospital Ethics Committee and a written informed consent was obtained. Genomic DNA isolated from peripheral blood was prepared and the PCRs were performed. Genotyping for CYP3A5 (\*3 allelic variant), the CYP2C9 (\*2 and \*3 allelic variants, PM status), CYP2D6 (\*3, \*4, \*5 and \*6 alleles associated with the PM phenotype) and Apo-E (E2, E3 and E4 allelic variants) polymorphisms was carried out. Statistical analysis was performed using SigmaStat 3.0 (statistical significance  $p < 0.05$ ). No difference was shown either in the CYP2D6 or in the CYP2C9 PM carrier status among statin intolerant patients vs controls. Furthermore no statistically significant difference in side effects between CYP3A5\*3/\*3 and\*1/\*3 allele carriers was found. Nevertheless CYP2D6\*4 carriers present significantly higher efficacy in terms of COLt and LDLc lipid lowering effect when compared to wild type phenotype carriers. Moreover, Apo-E E2/3 allele carriers have a significant HDLc increase with respect to E4 carriers. These last results should be confirmed in a large number of E2 carriers. Statins efficacy and toxicity are probably linked to a genetic background associated to haplotype that is still unknown but should be investigated in prospective to obtain a predictive genotype.

Franc S. et al. (2003) Cardiovasc. Drugs Ther. 17: 459-465.

**018****A SIMPLE DUPLEX-PCR PROTOCOL FOR ROUTINE DIAGNOSIS AND FOLLOW UP OF CANINE LEISHMANIASIS**

Franceschi A.; Compagnoni F.; Mancianti F.; Dipartimento Patologia Animale, Igiene e Profilassi degli Alimenti di Origine Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Viale piage 2 56124 PISA

Canine leishmaniasis is a common affection of dogs living in the mediterranean area. It is a progressive severe disease that eventually leads to chronic weight loss due to renal failure and death. It is transmitted by a sandfly and in Italy it is caused by *Leishmania infantum*, affecting a wide number of dogs. Due to the endemicity of the affection in some areas, and its increasing diffusion to non-endemic areas, practitioners are often facing a wide variety of clinical presentations, making diagnosis a challenging trial. In order to mend the outlined problems and to overcome the need of a robust routine diagnostic protocol, we designed an original duplex PCR assay targeting the *Leishmania infantum* KDNA minicircle and the canine GAPDH gene as an inner control of haemoglobin inhibition and efficacy of the DNA isolation process. Development of the assay with duplexing of the reaction, testing and application of this system on whole blood samples from a group of 15 dogs are described. Sensitivity of the assay was evaluated by the use of reference samples prepared by adding live promastigote to fresh blood. A concentration of 0.15 promastigote/ml of whole blood was assessed as threshold level. A group of 15 infected dogs was selected among the clinical cases admitted to the University of Pisa Veterinary clinic. Diagnosis of leishmaniasis was confirmed by a complete panel of blood analysis including blood cell count, serum biochemistry with attention to the values of albuminemia, azotaemia, and creatinin, electrophoresis of the serum proteins with assessment of albumin/globulin (A/G) ratio. IFAT analysis was performed with a threshold value of 1:80. All dogs were smear positive. The 15 selected subjects were then treated with meglumine antimoniate (75mg/kg sc. twice daily) and allopurinol (30mg kg per os once daily) for two months.

Animals were sampled at day 0, 7, 14, 21, 28, 50, 62 after onset of therapy. Our duplex assay was used to monitor the therapy progress along with the results of the other diagnostic procedures. All dogs reached a good clinical outcome, with remission of the signs at the end of the therapy. On day 0 (beginning of therapy) 10 dogs out of 15 gave a positive PCR result, while at day 28, only five were still positive. At the end of the therapy (day 62) three dogs still held a positive PCR result despite of their good clinical conditions.

**019****GENOTYPING OF SEVEN HUMAN HERPES VIRUSES BY REAL-TIME PCR ASSAY**

Rossi E.; Mantero G.; Albarosa R.; Briscini L.  
Biodiversity SpA via Corfù 71, 25124 Brescia

Herpes simplex virus (HSV) infections are common and may range from mild to severe disease. The availability of antiviral therapy and the high mortality associated with CNS disease (encephalitis) emphasizes a need for a prompt and accurate diagnosis; therefore, the availability of sensitive, specific and rapid laboratory test support is crucial to effective patient management

During the last 10 years, the introduction of PCR-based DNA typing technologies in clinical analysis applications has been highly successful.

This technology has become pervasive throughout clinical laboratories and it continues to grow in prevalence.

We present a new approach using a well-designed and tailored real-time PCR based methods which can establish whether or not Herpes virus are present in a clinical sample.

In this study we applied a new concept of real-time pcr with molecular probes, specific for the most common herpes virus affecting humans. This methods was optimized for the molecular diagnostics of eight herpes viruses, HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV8, HHV6. For comparison, all samples were genotyped by using direct sequencing.

This real time pcr assay exhibited a genotyping accuracy of 100% and, when compared to both standard PCR methods, was more sensitive. In addition, the method was technically simpler and more rapid.

We concluded that this real time pcr assay exhibited genotyping accuracy, was highly reproducible, was more sensitive and rapid than both PCR used, finally it was performed without postamplification steps, making this genotyping method ideal for routine in the diagnostic laboratories.

**020****ENDOTHELIN-1 LYS198ASN AND ET<sub>A</sub> RECEPTOR H323H POLYMORPHISMS AND RISK FOR CORONARY ARTERY DISEASE**

Ciofini E., Prontera C., Andreassi M.G., Clerico A., Biagini A., Colombo M.G.  
CNR Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Via Aurelia SUD, 54100 Massa, Italy

**Background.** Endothelin-1 (ET-1) plays an important role in vascular pathophysiology.

**Aim.** To assess whether genetic variations of endothelin-1 (ET-1), a Lys/Asn change at codon 198, and its receptor ET<sub>A</sub>, C/T in exon 6, H323H, were involved in the susceptibility to coronary artery disease (CAD) in the Italian population.

**Methods.** Genotyping at these two loci by PCR/restriction fragment analysis was performed 808 subjects who underwent coronary angiography (n=558 with CAD). The severity of CAD was expressed by means of the Duke score. Plasma ET-1 was assayed by Elisa in 93 randomly selected subjects (n=57 with CAD).

**Results.** The ET-1 Lys198Asn was significantly associated with the occurrence of CAD (p=0.03). The risk of CAD was independently increased among Asn/Asn in comparison to Lys carriers (OR 3.6, p=0.03). Moreover, plasma ET-1 levels significantly correlated with the severity of CAD (r=0.31, p=0.002) and the ET-1 Lys198Asn variation (Lys/Lys:2.0±0.7, Lys/Asn 4.1±1.4, Asn/Asn 16.2±14.7, pg/ml, p=0.007 by Scheffe). In contrast, the ET<sub>A</sub> receptor H323H was not associated with the disease (p=0.91). However, homozygous carriers of both variants showed a marked increase in the risk of CAD (adjusted OR=11.7, p=0.007, for Asn/Asn and TT vs Lys and C carriers of the ET-1 and ET<sub>A</sub> polymorphisms, respectively).

**Conclusions.** The ET-1 Lys198Asn variant seems to be associated with the presence of angiographically assessed CAD by influencing ET-1 plasma levels. Moreover, simultaneously carriers of both ET-1 Lys198Asn and ET<sub>A</sub> H323H polymorphisms might have a great susceptibility risk to CAD.

**021**

ANALISI MOLECOLARE CON TECNICA DHPLC E RICERCA DI GRANDI DELEZIONI SU PAZIENTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA NON CARATTERIZZATI CON INDAGINI DI I LIVELLO

Centrone C.<sup>1</sup>; Minuti B.<sup>1</sup>; Pelo E.<sup>1</sup>; Nadalin N.<sup>1</sup>; Repetto T.<sup>2</sup>; Ravenni N.<sup>2</sup>; Torricelli F.<sup>1</sup>;

1. Centro di Riferimento Regionale per la Caratterizzazione Genetica di Fibrosi Cistica, SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze  
2. Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, AO Meyer, Firenze

**Background :** La Fibrosi Cistica è la malattia multisistemica, a trasmissione autosomica recessiva, più comune nella popolazione caucasica. Le principali manifestazioni cliniche sono: malattia polmonare cronica ostruttiva, insufficienza pancreatica esocrina, infertilità maschile. Il gene responsabile della patologia, codifica per una proteina transmembrana detta CFTR ( Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), coinvolta nel trasporto del cloro. Ad oggi sono state identificate a carico del gene più di 1000 mutazioni di cui soltanto alcune hanno una frequenza superiore all' 1%, mentre nella maggior parte dei casi queste sono definite " private ". L' entità dei sintomi e il decorso clinico sono estremamente variabili. Lo studio del gene è articolato in 3 livelli diagnostici che si distinguono per tecnologia, tempi e costi.

**Metodi :** Il primo livello diagnostico ( PCR- OLA, Abbott-Celera Diagnostics ) ci ha permesso di caratterizzare il 71% degli alleli FC. Il rimanente 29% è stato studiato mediante DHPLC ( II livello ) con analisi delle porzioni codificanti del gene. E' stata inoltre effettuata la ricerca di grandi delezioni (III livello: SALSA CFTR MLPA kit, MRC Holland) su pazienti non caratterizzati con DHPLC.

**Risultati :** Con l' analisi del II livello abbiamo identificato un totale di 21 mutazioni, 10 grandi delezioni e 6 varianti non descritte oltre alla microdelezione 4169delCTAAGCC.

**Conclusioni :** Applicando il II e il III livello di diagnosi abbiamo incrementato la detection rate di mutazioni di circa il 14%.

**022**

SCREENING RAPIDO DELLE MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y MEDIANTE MULTIPLEX PCR SEGUITA DA ELETTROFORESI CAPILLARE

Coto I.,\* Fattoruso O.,\* Castaldo G.°, Sacchetti L.\*

\*Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche Università "Federico II", via S. Pansini 5, 80131 Napoli; \*CEINGE Biotecnologie Avanzate via Comunale Margherita 482, 80145 Napoli; °Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università del Molise, Isernia, Italia.

**Introduzione** Le microdelezioni del cromosoma Y sono una delle cause genetiche più frequenti di alterata spermatogenesi, con una prevalenza in media dell'8% (1). Lo screening delle microdelezioni viene effettuato di routine nell'iter diagnostico dell'infertilità maschile, in seguito alla sempre maggiore diffusione delle tecniche di fecondazione assistita (1). I kits commerciali prevedono l'analisi delle multiplex-PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio (1).

**Scopo** Applicare l'elettroforesi capillare per un'analisi più efficiente delle multiplex-PCR, nello screening delle microdelezioni dell'Yq.

**Materiali e metodi** Abbiamo implementato la valutazione delle STSs previste dalle linee guida dell'Accademia Europea di Andrologia, utilizzando 18 STSs specifiche, 8 di 1° livello e 10 di estensione, più le STSs dei controlli SRY e ZFX/Y. Esse sono state amplificate in 3 reazioni di multiplex-PCR fluorescenti ed analizzate mediante elettroforesi capillare su ABI Prism 3100 (2). Il metodo è stato validato su un gruppo di 207 maschi, (n=80 maschi fertili padri di almeno due figli, n=54 infertili idiopatici con azo- o oligo-zoospermia non ostruttiva, n=20 infertili con azo- o oligo-zoospermia secondaria, n=53 maschi provenienti da coppie sterili), previamente caratterizzati per le microdelezioni dell'Yq con multiplex-PCR seguite da elettroforesi su gel d'agarosio.

**Risultati** Il metodo consente di tipizzare, per le 8 STSs di primo livello, fino a 45 campioni in circa 3 ore, con elevata riproducibilità ed efficienza diagnostica, rispetto alle 6 ore della precedente metodologia. I risultati dei 207 campioni tipizzati sono concordanti con quelli precedentemente ottenuti mediante elettroforesi su gel di agarosio.

**Conclusioni** La valutazione delle microdelezioni del cromosoma Y mediante multiplex-PCR seguita da elettroforesi capillare è un metodo rapido, efficiente e di ampia riproducibilità analitica.

**Bibliografia**

- 1) Simoni M. et al., Int. J. Androl., 2004, 27:240-249.
- 2) Bor P. et al., J Assist. Reprod. Genet, 2003, 20: 46-51.

Ringraziamenti: Il lavoro è stato finanziato da CEINGE Regione Campania (Convenzione del G.R. 27/12/2002 N° 6276) e Regione Campania PF Ricerca Sanitaria DG 10 del 21/01/2005.

### 023

#### NEW ASSAY FOR THE DETECTION AND SUBTYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES ASSOCIATED WITH HIGH & LOW RISK OF CERVICAL CANCER

Rossi E., Mantero G., Briscini L.  
Biodiversity s.p.a, Via Corfù 71, 25124 Brescia

Human papillomaviruses (HPVs) comprise more than 120 putative virus types, of which 40 types are associated with lesions of the anogenital tract.

The genitalmucosal HPV types have been divided into cluster of types with a relative high risk or a relative low risk of an HPV infection progressing into cervical cancer.

We report a new real-time PCR method using the SYBRGreen system for HPV detection and classification in high and low risk types.

HPV dna extracted from genital swabs were sequenced and were analyzed for sequence homology by creating multiple DNA sequence alignments by using the CLUSTAL W program. Based on the alignments, we designed a degenerate PCR primers that amplify the HPV E1 gene and that, used in two separate 50µl reactions, permit to classify HPV in high and low risk types.

This assay is able to detect 24 of the major HPV high risk types :16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 73, 82 etc and 12 of the low risk types: 6, 11, 32, 40, 42, 43 etc.

This method is well suited to HPV detection, since it is simple to perform, rapid, highly specific and sensitive; is able to discriminate between different HPV types and to recognize multiple infections.

### 024

#### GENE EXPRESSION PROFILE IN THE X-LINKED ALPHA THALASSEMIA MENTAL RETARDATION SYNDROME (ATR-X).

Barresi V.<sup>1</sup>; Ragusa A.<sup>6</sup>; Fichera M.<sup>6</sup>; Castiglia L.<sup>6</sup>; Rappazzo G.<sup>3</sup>; Travali S.<sup>2</sup>; Mattina T.<sup>4</sup>; Romano C.<sup>6</sup>; Cocchi G.<sup>5</sup>; Condorelli D.F.<sup>1\*</sup>

1. Dept Chem Sci, 2. Biom Sci, 3. Animal Biol, 4. Pediatrics, University of Catania, Catania, Italy 5. ICPPN, Bologna, Italy 6. IRCCS OASI Maria SS, Troina, Italy

ATR-X is a severe X-linked disorder characterised by mental retardation, facial dysmorphism, urogenital abnormalities and alpha thalassemia. The disease is caused by mutation in ATR-X gene which protein belongs to the SWI/SNF DNA helicases and contains three C2-C2 type zinc fingers of unknown function. Since it seems that ATR-X/XNP protein could regulate gene transcription at the chromatin level, we analyzed, by cDNA microarray (Human UniGene 1 Microarray; Incyte Genomics, St. Louis, Missouri, USA), the variation in expression of approximately 8524 human transcripts from ATR-X subjects in comparison to that from a pool of normal males of comparable age. Total RNA extracted from blood lymphomonocytes was used for the microarray experiments. The results, analyzed by GEMTOOLS Analysis Software, showed that 35 genes had a lower expression (30-35% of control pool) while 25 transcripts were expressed more than twice in comparison to controls. We confirmed the observed changes by performing a quantitative Real-Time PCR assay for 7 selected genes using RNA extracted from blood lymphomonocytes and cultured immortalized lymphocytes: oligophrenin 1, GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase pp125FAK (GRAF), alpha and beta globins, beta putative lymphocyte G0/G1 switch gene, HAIK1 type I, intermediate filament cytokeratin. Moreover, The decrease of the alpha globin/beta globin mRNA ratio was also confirmed in RNA samples extracted by reticulocytes. We have also examined the expression pattern of the GRAF gene in human tissues and organs, showing the predominant brain expression of a novel splicing isoform. In conclusion, our data support the hypothesis of a primary role for altered gene expression in ATR-X syndrome and suggest genes that can be involved in the pathogenesis of the mental retardation.

## 025

## QUANTIFICAZIONE DELLA MUTAZIONE 3460 G→A/ND1 (LHON) MEDIANTE REAL TIME PCR QUANTITATIVA

Pallotti F<sup>1</sup>, Genasetti A.<sup>1</sup>, Valentino ML<sup>2</sup>, Carelli V<sup>2</sup>, Vigetti D<sup>2</sup>, Viola M<sup>1</sup>, Karousou E<sup>1</sup>, Passi A<sup>1</sup>, Melzi d'Eril GV<sup>3</sup>, De Luca G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>DSBSC, Via JH Dunant 5, Università degli Studi dell'Insubria, Varese, <sup>2</sup>Dip. di Scienze Neurologiche, Via Foscolo 3, Università degli Studi di Bologna, <sup>3</sup>Ospedale San Paolo, Via di Rudini 8., Università degli Studi di Milano.

**Obiettivo** La messa a punto di una metodica quantitativa in alternativa alla PCR/RFLP per quantificare il carico mutazionale nella Neuropatia Ottica Ereditaria di Leber (LHON) in campioni di sangue di 15 individui con mutazione a carico del DNA mitocondriale (mtDNA) 3460 G→A/ND1.

**Metodologia** È stata standardizzata una tecnica di real time PCR con amplificazione allele specifica (ARMS), utilizzando come calibratore il mtDNA totale (mutante + wild type). Quindi è stata paragonata la metodica con utilizzo del SYBR® green ad una che prevedeva l'uso di una sonda (Saggio Taq-Man) ed i risultati ottenuti con entrambe sono state poi confrontati a quelli dell'analisi eseguita con PCR/RFLP radioattiva.

**Risultati** Entrambe le tecniche di Real Time PCR sono risultate riproducibili e la loro sensibilità permette di evidenziare percentuali di mutazione inferiori all'1%. La metodica con SYBR green presenta un coefficiente di correlazione R<sup>2</sup>= 0,940 rispetto alla quantificazione con RFLP, mentre l'utilizzo della sonda rispetto all'RFLP ha una correlazione R<sup>2</sup>= 0,950. Utilizzando una miscela di plasmidi mutanti e wild type in modo da costruire una curva con quantità note di mutante, il saggio Taq-Man presenta una R<sup>2</sup>= 0,995 tra percentuali attese e calcolate. La metodica di RFLP può avere portato ad una sovrastima del mutante, avendo utilizzato nel saggio un taglio della popolazione wild-type, mentre l'uso del SYBR green potrebbe avere sottostimato la popolazione mutante, essendo presente una minima quota di prodotto aspecifico nell'amplificazione selettiva del wild-type.

**Conclusioni** Entrambe le metodiche di real time PCR sono risultate migliori dell'approccio con RFLP, in quanto permettono l'analisi quantitativa senza la digestione mediante RFLP. La metodica Taq-Man è più precisa rispetto all'uso del SYBR green in quanto l'amplificato aspecifico non è osservato. Il continuo monitoraggio dell'eteroplasma in pazienti con patologie mitocondriali richiede una metodica standardizzata sicura e riproducibile per la quantificazione della mutazione in vari tessuti di vari individui della stessa famiglia del probando, in modo da poter avere una corretta correlazione genotipo-fenotipo.

**Bibliografia** Wong LJ, and Boles RG, Clin Chim Acta, 354, 1-20 (2005)

## 026

## THE PIA1/A2 POLYMORPHISM OF PLATELET GLYCOPROTEIN IIIA IS NOT IMPLICATED IN THE PLATELET REACTIVITY

Federici C., Parri M.S., Botto N., Manfredi S., Gianetti J., Clerico A., Andreassi M.G.

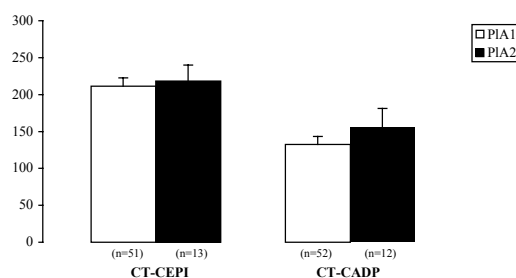
CNR, Institute of Clinical Physiology, "G. Pasquinucci" Hospital, Massa, Italy

**Background:** Platelet reactivity is emerging as a strong predictor of recurrent ischemic events in patients with coronary artery disease (CAD). Recently, the PIA1/PIA2 polymorphism (Leu33Pro) of the platelet glycoprotein (GP) IIIa gene has been suggested to play an important role in both platelet reactivity and the response to antiplatelet drugs.

**Aim:** The aim of this study was to investigate the functional role of the PIA1/PIA2 polymorphism in platelet reactivity.

**Methods:** Sixty-four patients (50 male, 64.1±1.2 years) with stable CAD taking aspirin were enrolled in this study. The aggregation state was measured by the platelet function analyzer (PFA)-100 monitoring collagen/epinephrine closure time: CT(CEPI) for the assessment of the efficacy of aspirin on platelet activation, and collagen/ADP-coated cartridge (CADP) for the evaluation of platelets' ability to adhere and aggregate in whole blood. Genotyping of the polymorphism (PIA1/A2) was performed by using a polymerase chain reaction-based restriction fragment-length polymorphism analysis.

**Results:** The distribution of the genotype were 79.7, 17.2 and 3.1% for PIA1/A1, PIA1/A2 and PIA2/A2, respectively. The mean CT-CEPI cartridges was 212.7±9.9. The mean CT-CADP cartridges was 136.6±77.4. PFA-100 closure time for both CEPI and CADP were not different between A1 genotypes and carriers of the A2 allele (Figure).



**Conclusions:** Our data suggest that the PIA1/A2 polymorphism of GP IIIa is unlikely to exert important effects on platelet reactivity.

**027****PPAR GAMMA AND SSAT GENE EXPRESSION IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA**

M.Linsalata, R.Giannini, M. Notarnicola and A. Cavallini

Laboratory of Biochemistry, National Institute of Digestive Disease, Castellana Grotte, ( BA)

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) belongs to a family of ligand-activated nuclear transcription factors. There are now increasing evidence to indicate a role for this receptor in regulation of cell growth. Moreover, it has been shown that PPAR  $\gamma$  gene expression is elevated in selected human colon cancer cell lines (1). Spermine/spermidine-N<sup>1</sup>-acetyltransferase (SSAT) is a key enzyme in the catabolism of polyamines, substances involved in cell proliferation and neoplastic transformation. It has been observed an increased activity of SSAT in the tumors and experimental evidences show a PPAR  $\gamma$  specific effect on the SSAT promoter (2). For the above mentioned, the aim of this study was evaluate PPAR $\gamma$  and SSAT gene expression in human colorectal carcinoma. **MATERIALS AND METHODS** : 20 patients (12 males and 8 females, mean age 65 yrs, range 33-80) with colorectal carcinoma entered the study. Expression of PPAR $\gamma$  and SSAT mRNA was examined by real time PCR, in both neoplastic tissue and normal surrounding mucosa. Data were statistically assessed by Wilcoxon test and Spearman correlation test. **RESULTS**: PPAR $\gamma$  and SSAT gene expression was significantly higher in neoplastic tissue than in normal colonic mucosa ( $p < 0.002$  and  $p < 0.0001$ , respectively). In normal and neoplastic tissue there were significant and positive correlations between PPAR $\gamma$  and SSAT expression ( $r = 0.77$ ,  $p < 0.001$ ; and  $r = 0.60$ ,  $p < 0.02$ , respectively). **CONCLUSION**: our results suggest that PPAR $\gamma$  is involved in the control of normal and neoplastic cell growth of the colon by a mechanism that induce SSAT gene expression. The higher expression of PPAR $\gamma$  and SSAT genes observed in neoplastic tissue may be a natural reaction to inhibit the accumulation of polyamines and the proliferation of malignant cells.

(1)Carcinogenesis 1998;19:49-53; (2)Molecular Carcinogenesis 2004;39:91-102.

**028****HR-CGH (HIGH RESOLUTION COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION) NELLO STUDIO DEL RITARDO MENTALE NON SINDROMICO**

Parrini D.<sup>1</sup>; Nannetti G.<sup>1</sup>; Relisti V.<sup>1</sup>; Carniani S.<sup>1</sup>; Nutini A.L.<sup>1</sup>; Pecile V.<sup>2</sup>; Lenzini E.<sup>3</sup>; Torricelli F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SOD Diagnostica Genetica AOU Careggi Firenze

<sup>2</sup> U.O.C. di Genetica IRCCS Burlo Trieste

<sup>3</sup> Centro Malattie Rare Dipartimento di Pediatria Università di Padova

Il ritardo mentale (RM) non sindromico è un disordine comune stimato dall'OMS con una prevalenza tra 1 e 3% nella popolazione generale. Tuttavia, sebbene un ampio numero di studi sia focalizzato sull'eziologia del RM, la causa di tale condizione rimane sconosciuta circa nel 50% dei casi. Nell'ultimo decennio l'utilizzo di tecniche di citogenetica molecolare ha dimostrato che le alterazioni cromosomiche criptiche giocano un ruolo importante in questo campo. Si riportano i dati relativi ad uno studio eseguito con HR-CGH su un gruppo di soggetti (50) con RM non sindromico provenienti da 3 centri Italiani (Firenze, Padova, Trieste). I casi, sono stati selezionati con i seguenti criteri: Ritardo mentale da medio a grave, dimorfismi faciali e/o malformazioni. La sensibilità e la risoluzione di questo metodo impone alcune limitazioni nel suo impiego per questo motivo tutti i casi da analizzare sono stati sottoposti in precedenza ad indagini citogenetiche ad alta risoluzione, analisi di X fragile e studio dei riarrangiamenti subtelomerici. La HR-CGH consiste in una ibridazione in situ modificata che sfrutta la competizione tra due DNA genomici (test e controllo) al fine di evidenziare guadagni o perdite di materiale genetico; tale tecnica consente di poter individuare in tutto il genoma aberrazioni cromosomiche interstiziali che sono state dimostrate essere una possibile causa del ritardo mentale non sindromico. I profili di HR-CGH vengono valutati utilizzando un intervallo di riferimento dinamico al posto di quello fisso utilizzato nella CGH classica, tale da consentire l'analisi di dimensioni molto ridotte (dell'ordine di 3 Mb) rispetto alla CGH convenzionale.

Questo studio ha rivelato la presenza di più alterazioni strutturali sbilanciate sui casi esaminati, tutti confermati con FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) con sonde locus specifiche. In questo lavoro vengono valutate l'utilizzazione e l'efficacia diagnostica di questo test nell'ambito del ritardo mentale non sindromico.

## 029

## ANALISI GENETICA DI MASCHI INFERTILI DELL'AREA CAMPANA

Fattoruso O.,\* Coto I.,\* De Rosa M.,# Zarrilli S.,# Lombardi G.,# Sacchetti L.\*

\*Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, #Dipartimento di Endocrinologia e Oncologia Molecolare e Clinica, Università "Federico II", via S. Pansini 5, 80131 Napoli, \*CEINGE Biotecnologie Avanzate, via Comunale Margherita 482, 80145 Napoli, Italia.

**Introduzione** L'infertilità colpisce circa il 10-15% delle coppie ed è dovuta in circa il 50% dei casi al partner maschile (1). La maggiore diffusione delle tecniche di fecondazione assistita, con la possibilità di trasmissione alla prole di anomalie genetiche, ha favorito lo studio dei fattori genetici associati ad infertilità maschile. Le anomalie cromosomiche e le microdelezioni dell'Y sono le cause genetiche più frequenti e riconosciute di infertilità, mentre sono contraddittori i risultati sull'associazione tra moderate espansioni della tripletta CAG ( $\geq 26$ ) nel recettore per gli androgeni (AR) e alterazioni della spermatogenesi (2). Tuttavia in circa l'85% dei casi non è possibile identificare una causa genetica di infertilità (1-3).

**Scopo** Nel nostro studio, l'analisi genetica di maschi infertili dell'area Campana ha previsto: a) l'esame del cariotipo, b) lo screening delle microdelezioni dell'Yq, c) l'analisi dell'espansione della tripletta CAGn del AR.

**Materiali e metodi** Sono stati analizzati 74 maschi infertili (n=54 idiopatici con azo- o oligo-zoospermia non ostruttiva, n=20 con azo- o oligo-zoospermia secondaria) più 80 maschi fertili padri di almeno due figli.

**Risultati** Le anomalie cromosomiche erano presenti nell'8,1% dei soggetti infertili (6/74). La prevalenza delle microdelezioni era pari al 9,46% nel gruppo degli infertili totale (7/74) e al 13% nel gruppo degli idiopatici (7/54). Tra le regioni microdelete dell'Y, l'AZFc era delecto nel 57,1%, l'AZFb nel 14,2%, l'AZF b+c nel 28,6% dei casi. La mediana dell'espansione AR-CAGn era 23 (range 12-29) negli infertili idiopatici senza altra causa genetica, 20 (18-24) nei secondari, 20 (14-26) nei controlli fertili. Inoltre la percentuale di soggetti con AR-CAGn  $\geq 26$  era dell'11,6% negli infertili idiopatici contro l'1,2% nei soggetti fertili.

**Conclusioni** Il nostro lavoro rappresenta il primo studio di cause genetiche di infertilità maschile nell'area Campana e i risultati inerenti le frequenze variano a seconda dei criteri di selezione dei pazienti, in accordo con i dati della letteratura.

#### Bibliografia

- 1) Simoni M. et al., Int. J. Androl., 2004, 27:240-249.
- 2) Yong E.L. et al., Hum. Reprod., 2003, 9:1-7.
- 3) Cram D.S. et al., J. Androl., 2001, 22:738-746.

*Ringraziamenti: il lavoro è stato finanziato da CEINGE*

Regione Campania (Convenzione del G.R. 27/12/2002 N°6276) e Regione Campania PF Ricerca Sanitaria DG 10 del 21/01/2005.

## 030

## INTERFERON GAMMA (IFNg) AND INTERLEUKIN 10 (IL10) HAPLOTYPES DIFFERENTLY INFLUENCE H. PYLORI INFECTION OUTCOME.

Schiavon S., Zambon C-F.\*, Basso D., Falda A., Stranges A., Belluco C.^, Di Mario F.°, Navaglia F., Fogar P. \*, Greco E., Rugge M.§, Plebani M. Departments of Laboratory Medicine, \*Medical and Surgical Sciences, ^Oncological and Surgical Sciences and §Pathology, University of Padova; °Department of Gastroenterology, University of Parma; Italy.

IFNg is associated with the development of Th-1-like, cell mediated immune responses and plays a pivotal role in H. pylori infected mucosa, as does the anti-inflammatory cytokine IL10. Our aims were to ascertain whether the haplotypes made of 1. intron 1 IFNg +874TA SNP and CA repeat polymorphism or 2. IL10 -1082AG, -819CT and -592AC SNPs, influence H. pylori infection outcome and mucosal inflammation. H. pylori infected patients were studied: 100 non cardia gastric cancer (NCGC), 28 duodenal ulcer (DU) and 71 chronic gastritis (CG). The haplotypes were estimated using the Arlequin software Ver2.000. Nine possible IFNg haplotypes were found, the most frequent being A-13 and T-12. DU was less frequent in T-12 haplotype with respect to NCGC ( $X^2=23.6$ ,  $p<0.01$ ) or CG ( $X^2=17.0$ ,  $p<0.01$ ). Three possible IL10 haplotypes (-1082, -819, -592) were identified, ACC, ATA, GCC, none being correlated with disease diagnosis. None IFNg or IL10 haplotypes were correlated with gastritis grade or intestinal metaplasia. Six possible IL10 genotypes were inferred: ACC/ACC, ACC/ATA, ATA/ATA, ACC/GCC, ATA/GCC, GCC/GCC. The ATA/ATA was more frequent in NCGC with respect to CG ( $X^2=4.04$ ,  $p<0.05$ ). ATA/ATA was more frequent while GCC/GCC was less frequent in CG patients with than in those without intestinal metaplasia ( $X^2=11.04$ ,  $p<0.05$ ). In conclusion the IFNg high producer haplotype T-12 was protective for DU, probably because of the inhibitory effect on acid secretion of this cytokine. The attenuated IL10 response of ATA/ATA low producers is probably implicated in the development of precancerous (intestinal metaplasia) and cancerous H. pylori associated lesions.

C-F Zambon, D Basso, F Navaglia, A Falda, C Belluco, et al.. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterology 2004;126:382-4.

**031****B-CLL APOPTOTIC SIGNAL: A MICROARRAY APPROACH**

Carlucci F., Floccari F., Marinello E., Pagani R., Raspadori D. #, Rosi F., Tabucchi A.  
 Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica. #Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche - Università degli Studi di Siena. Via A. Moro, 2 - 53100 Siena

**Background:** B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is an adult-onset heterogeneous malignancy characterized by the accumulation of long-lived B lymphocytes. Most of the circulating cells appear to be nondividing and the clonal excess is mainly caused by defects that prevent programmed cell death rather than alterations in cell cycle. The regulation of cell death is thought to play a fundamental role in the natural evolution of malignancy and in the response of tumors to chemotherapy. B-CLL is an attractive model to investigate the regulation of apoptosis, independent of cell cycle progression, because of its slow population doubling time and the ready accessibility of malignant cells. In previous studies we found imbalanced purine metabolism in B-CLL lymphocytes, we also found decreased activity of three 5'-nucleotidase isoforms: ecto 5'-NT (e-N or CD73), e-Ns derived from e-N and cytosolic c-N-II (1). Analyzing ecto 5'-NT expression by FACS, we found that most B-CLL cells were CD73-negative. CD73 regulates adenosine availability, influencing cell energy, signal transduction and cell maturation. Since extracellular adenosine induces apoptosis via A2b receptors, enzymes such as CD73 involved in adenosine metabolism could play a role in B-CLL cell resistance to apoptosis. **Methods:** The microarray technique is a high-throughput procedure for simultaneously analyzing expression levels. We set up a 50 gene chip for the analysis of protein we think could be of interest in B-CLL study. Among these we remember the enzymes of purine nucleotide de novo synthesis, enzymes of salvage and catabolic pathway, CD26 and adenosine receptors, proteins related to signal trasduction and cell damage (oxydative stress, apoptosis). **Results and Conclusions:** Preliminary results identified many genes of purine metabolism with different expression from controls. Among de novo enzymes, the gars-airs-gart complex was overexpressed and IMP dehydrogenase seemed underexpressed. Of salvage pathway enzymes, APRT seemed underexpressed but HGPRT was unchanged. Regarding apoptosis related proteins it is interesting to note that in a patients with markely reduced eN activity there is an under-expression for Bax (Bcl2-associated X protein), pro-apoptotic protein. The microarray technique seems promising for the study of purine metabolism and apoptosis resistance in B-CLL cells. At least a subset of the genes identified are worthy of further study.

1- Carlucci F. et al. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1454 (1):106-14.

**032****COMPARISON BETWEEN THREE MOLECULAR METHODS FOR DETECTION OF BLOOD MELANOMA TYROSINASE MRNA.**

\*Santonocito C.; \*Concolino P.; °Lavieri M.M.; \*Ameglio F.; §Gentileschi S.; °Capizzi R.; \*Rocchetti S.; \*Zuppi C.; \*Capoluongo E.

\*Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry & Clinical Biochemistry; ° Department of Dermatology; §Plastic Surgery Hospital Unit - Catholic University, Rome, Italy

**Background:** The molecular monitoring of circulating tumor cells by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) for patients with melanoma, is still under debate. It may be affected by: a) pre-analytical variability, b) frequency of melanoma-associated gene transcripts and c) the reliability of the methods employed. Few commercial methods are available for the detection of tyrosinase mRNA in blood.

**Objective:** comparison between two RT-PCR-nested methods with a third one based on real-time methodology, for detection and quantitation of tyrosinase transcripts, respectively. **Methods:** Sixty-two melanoma patients with different AJCC stages and 20 healthy subjects were enrolled. All blood samples were extracted in duplicate with two different methods. Two nested-PCR methods (one commercial and one in house) plus a real time commercial kit were employed. **Results:** the two nested PCR methods employed were overimposable, specific and sensitive, at least in the stage III, where there was a concordance between sentinel lymph nodes detection and blood tyrosinase positivity. the different extraction methods did not affect the quality of results, while the commercial real-time kit cannot be used for quantitative assay of tyrosinase transcripts. **Conclusion:** Tyrosinase mRNA detection may be therefore employed to monitor the melanoma patients over time in function of response to therapy, especially in the stage III and IV of melanoma disease.

**033****POLIMORFISMO SDF1-3'UTR-801G-A E RISCHIO TROMBOTICO NEI PAZIENTI CON POLICITEMIA VERA E TROMBOCITEMIA ESSENZIALE**

La Torre A, Battaglioli L, Turri O, Erario M, \*Gerli GC, \*Melzi d'Eril GV, Biondi ML  
Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche \*Dip Med,Chir e Odont, Università degli Studi di Milano, Az Ospedaliera San Paolo, Milano

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), costituzionalmente prodotto dalle cellule staminali del midollo osseo, appartiene alla famiglia delle chemochine CXC ed è in grado di indurre chemotassi sulle cellule che esprimono il recettore CXCR4 come macrofagi, monociti, linfociti B e T, piastrine e megacariociti. SDF-1 svolge un ruolo importante nell'ematopoiesi essendo coinvolto nella migrazione delle cellule progenitrici ematopoietiche. E' inoltre il primo fattore chemotattico evidenziato per le cellule progenitrici CD34+ di cui promuove anche la sopravvivenza. Recentemente è stato ipotizzato che SDF-1 possa essere coinvolto nella neoangiogenesi. Inoltre, vi sono evidenze che possa partecipare nel processo aterotrombotico attraverso un forte potere chemoattrattivo su monociti e linfociti, il cui accumulo a livello endoteliale sta alla base di tale patologia, ed un effetto diretto nell'indurre l'attivazione piastrinica. E' riconosciuto un polimorfismo nella regione non tradotta (3'UTR-801G-A). Il genotipo SDF-1-3'AA determina un aumento della quantità di proteina SDF-1 in grado di legarsi al suo recettore CXCR4.

*In questo lavoro abbiamo studiato il possibile legame tra il polimorfismo SDF1-3'G/A e due malattie mieloproliferative: la Policitemia Vera (PV) e la Trombocitemia Essenziale (ET). 73 pazienti con PV e ET e 139 controlli normali sono stati studiati. Il polimorfismo SDF1-3'G/A è stato determinato mediante PCR e enzimi di restrizione.*

La distribuzione genotipica è risultata significativamente differente nei pazienti con PV e ET rispetto ai controlli. Lo stato omozigote del polimorfismo è fortemente associato con l'insorgenza di PV (OR, 8.35; 95% CI, 2.06-33.85; p=0.002). Inoltre i pazienti con PV o ET omozigoti per l'allele A hanno un rischio cinque volte maggiore di andare incontro ad eventi trombotici rispetto ai pazienti AG o GG (OR, 4.67; 95% CI, 1.09-19.90;p=0.038).

*Tali dati suggeriscono che lo stato omozigote per l'allele A nella posizione 801 del gene SDF-1 svolge un ruolo importante nella predisposizione genetica a sviluppare PV ed è un fattore di rischio aggiuntivo per eventi trombotici nei pazienti con PV o ET.*

**034****PROPOSTA DI OTTIMIZZAZIONE DEL METODO DI POORT PER IL POLIMORFISMO G20210A DEL GENE DELLA PROTROMBINA.**

Fontanini E., Falletti E., Gonano F.  
Laboratorio Analisi - Policlinico Universitario di Udine

La protrombina o fattore II (FII) della coagulazione svolge un ruolo fondamentale nella cascata coagulativa. La sua attivazione in trombina porta alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina e alla formazione del coagulo.

Nel 1996, Poort et al.<sup>(1)</sup> hanno descritto una variante genetica comune nella regione non trascritta 3'UTR del gene della protrombina (FII G20210A) che, aumentando l'espressione e la stabilità dell'mRNA, incrementa i livelli plasmatici di FII ed innalza il rischio trombotico. Nella popolazione generale la frequenza allelica della variante è bassa (1-1.5%), con una percentuale di eterozigoti del 2-3%. Nello screening genetico per rischio trombofilico, molti laboratori utilizzano la metodica descritta da Poort per individuare la mutazione G20210A. La variante viene identificata in RFLP (Restriction fragment length polymorphism) e prevede l'amplificazione di un frammento di 345 paia di basi (bp) che, dopo digestione enzimatica, genera negli omozigoti AA due bande rispettivamente di 23 e 322 bp ed una unica banda non tagliata di 345 bp negli omozigoti GG. La separazione ottimale dei frammenti di 322 e 345 bp su gel di agarosio al 3-3.5% richiede tempi di corsa elettroforetici molto lunghi, intorno alle 2 ore. Scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica che consenta una riduzione dei tempi elettroforetici ed un miglioramento nella separazione tra le bande. Una porzione del gene della protrombina è stata da noi amplificata in PCR, usando un primer interno senso all'amplicone di Poort, 5'-TCCTGGAACCAATCCCGTGA-3' (nucleotidi 21463-21483) ed il primer antisense mutagenico 5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAA\*GC-3' (nucleotidi 20233-20212) utilizzato nella metodica originale. Le condizioni di amplificazione, in un volume finale di 10 µl, prevedono 31 cicli: 93°C per 60 s, 57°C per 60 s e 72°C per 60 s. Il DNA amplificato viene digerito con l'endonucleasi Hind III (A/AGCTT), il cui sito di taglio è presente solo nell'allele 20210A. Si ottengono frammenti di 23 e 76 bp nell'omozigote AA e di 99 bp nell'omozigote GG, i quali vengono separati su gel di agarosio al 3-3.5% dopo 30 minuti. I vantaggi di questa metodica sono di diminuire i tempi di corsa elettroforetici su gel di agarosio, passando dai 120 minuti della metodica originale ai 30 minuti della metodica proposta, ottenendo contemporaneamente una migliore separazione delle bande relative agli alleli normali e mutati.

<sup>(1)</sup> Poort R. et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 1996; 88:3698-3703

**035****MESSA A PUNTO DELLA METODICA CGH-ARRAY PER LA COSTRUZIONE DI ARRAY LOCUS SPECIFICI**

Marseglia G.; Nannetti G.; Magi A.; Bernabini S.; Relisti V.; Pecile V. <sup>◊</sup>; Lenzini E. <sup>\*</sup>; Gatto S. <sup>\*</sup>; Torricelli F.

SOD Diagnostica Genetica Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi, Firenze.

<sup>◊</sup>U.O.C. di Genetica IRCCS Burlo, Trieste.

<sup>\*</sup>Centro Malattie Rare Dipartimento di Pediatria Università di Padova.

<sup>\*</sup>AB Analitica Padova.

L'avvento della CGH-Array descritta per la prima volta nel 1997, ha aperto la strada alla possibilità di una più alta e più ampia risoluzione nella rilevazione delle anomalie cromosomiche strutturali. Dai dati riportati in letteratura, la CGH-Array si presenta come il metodo più utile per rilevare e localizzare simultaneamente perdita o guadagno di materiale genetico, per tale motivo la sua applicazione è in rapido incremento anche nello studio di malattie genetiche, congenite ed acquisite.

Lo scopo del nostro lavoro è quello di sviluppare la metodica di CGH-array, dalla stampa dei vetrini al protocollo di ibridazione, per la costruzione di array locus specifici che permettano di analizzare contemporaneamente più regioni cromosomiche di interesse e di poter quindi stampare dei vetrini personalizzati.

Per la messa a punto della metodica, come modello iniziale abbiamo scelto di studiare soggetti affetti da ritardo mentale idiopatico precedentemente caratterizzati nel nostro laboratorio mediante Hr-CGH e metodica FISH. Per tale motivo abbiamo stampato vetrini, confrontando strumenti di nuova e vecchia generazione, utilizzando più sonde per ciascuna regione subtelomeriche e abbiamo sviluppato il protocollo di ibridazione che prevede la competizione tra due campioni di DNA genomico (test e controllo) marcati con due diversi fluorocromi e coibridati sull'array. La rilevazione dei segnali di fluorescenza è resa possibile mediante l'utilizzo di uno scanner e la presenza di riarrangiamenti cromosomici nel DNA test viene valutata mediante la quantificazione delle differenze esistenti nell'emissione di fluorescenza tra il test e il controllo. La metodica così ottimizzata è stata applicata ad un campione di soggetti affetti da ritardo mentale idiopatico e l'analisi statistica ha evidenziato che la CGH-array permette sia di confermare i risultati ottenuti precedentemente con le due metodiche di citogenetica molecolare sia di evidenziare nuove anomalie cromosomiche.

**036****METHIONINE LOADING TEST AND GENETIC RISK FACTORS IN SUBJECTS AFFECTED BY THROMBOEMBOLIC DISEASE**

Scazzone C., Caruso A., Lio E., Bivona G., Ciaccio M.

Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

**Introduction:** Hyperhomocysteinaemia (HHcy), defined as an elevated concentrations of homocysteine (Hcy) in the fasting state or after methionine loading, is recognized as a risk marker for a number of important human pathologies: premature atherosclerosis, venous thrombosis, vascular dementia and coronary artery disease. Plasma Hcy concentrations are influenced by both environmental and genetic factors. The first include low dietary intake of folate and Vitamin B12, smoking, and obesity. In the polymorphisms genetics investigated: MTHFR C677T, Factor V Leiden (FV) G1691A, Prothrombin (FII) G20210A.

The polymorphism of gene encoding MTHFR and folic acid nutritional status play important role in thrombotic disease. Precedent studies investigated the total Hcy-lowering effect of folic acid in response to the MTHFR genotype in patients who have thrombotic disease.

**Materials and Methods:** We have examined 16 subjects affecting by thromboembolic disease.

Total genomic DNA was extracted from whole human blood by salting-out procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction. The detection of the C677T in the MTHFR gene was investigated by the enzyme Hinf I. A similar protocol was used to analyze the FV mutant by using the restriction enzyme Mnl I. To detect the G20210A mutation, a 506-bp fragment from the 3'-untranslated region of FII gene was amplified by PCR using the mutagenic reverse primer. The nucleotide substitution close to the 3' end of the mutant oligonucleotide, combined with the genetic abnormality (20210 G to A) creates a new restriction enzyme cleavage site, which is recognized by Hind III. The restriction fragments were separated by electrophoresis agarose gel.

**Results:** In all our patients the value of basal Hcy and after methionine loading test were in the range. Of 16 subjects studied: 3 had no mutation (-/-), 8 were heterozygous (+/-) and 5 were homozygous (+/+) for the polymorphism C677T. While for the polymorphism of FV: 13 had no mutation (-/-), 1 was heterozygous (+/-) and 2 were homozygous (+/+); for the polymorphism of FII only one was heterozygous (+/-), the others were wild-type.

**Conclusions:** These results suggest that the MTHFR genotype is modulating the folate/ Hcy relationship in these studied samples. An important parameter is dietary intake as folic acid; in fact the patients examined have intaken vitamins before the loading methionine test. As a consequence, HHcy can be considered the result of a gene-nutrient interaction.

**References:** Klaus Kolling., et al. (2004) Am J Cardiol 93: 1201-1206

**037****SERCA2 AND PHOSPHOLAMBAN GENE EXPRESSION IN CONOTRUNCAL CONGENITAL HEART DISEASE**

Storti S., Cerillo A.G., Clerico A., Parri M.S., Festa P.L., Vittorini S.

Laboratorio di Cardiologia Molecolare e Genetica  
Unità operativa di cardiocirurgia  
Ospedale "G. Pasquinucci" IFC CNR, via Aurelia Sud, 54100, Massa

**Background.** In animal models of conotruncal heart defects, an abnormal myocardial function, associated with depressed excitation-contraction coupling and abnormal calcium sensitivity of the contractile apparatus has been described, and a depressed L-type calcium current has been observed. Sarcoplasmic reticulum (SR)  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA) is a membran protein catalyzing the ATP-dependent transport of  $Ca^{2+}$  from the cytosol to the SR. The activity of SERCA is inhibited by phospholamban (PLN), and both these proteins actively participate in the maintenance of the normal intracellular calcium handling.

**Objective.** Aim of this study was the evaluation of SERCA2a and PLN expression in the myocardial tissue of patients with Tetralogy of Fallot (TF).

**Materials and methods.** Atrial biopsies were collected before cardiopulmonary bypass from 23 ToF patients during surgery. The atrial tissue from 20 Atrial Septal Defect (ASD) patients was used as control. SERCA2a and PLN expression was semiquantitatively assessed by RT-PCR, using caldesmon RNA (Casq) as internal standard.

**Results.** TF patients were not significantly younger than ASD patients ( $38.9 \pm 53.0$  vs  $55.0 \pm 47.9$  months,  $p = 0.34$ ). Other demographic characteristics were similar in the two groups. The mean SERCA2a RNA concentration was 0.6/Casq and 0.3/Casq in TF and ASD patients respectively ( $p < 0.005$ ). The mean PLN RNA concentration was 0.3/Casq and 0.5/Casq ( $p = 0.08$ ).

**Conclusions.** The expression of the SERCA2a gene is significantly enhanced in TF patients, while the PLN gene expression appears to be reduced. This finding could be explained as a compensatory mechanism aimed to enhance the intracellular  $Ca^{2+}$  reserve in the face of reduced L-type calcium current. Further studies are needed to better characterize the molecular mechanism of  $Ca^{2+}$  turnover in TF.

**Reference.** Hutson M.R. and Kirby M.L. Birth Defects Research 69:2-13 (2003)

**038****PROTHROMBIN G20210A MUTATION IS A RISK FACTOR IN YOUNG ADULTS WITH CEREBRAL ISCHEMIA AND PATENT FORAMEN OVALE**

Botto N., Manfredi S., Federici C., Giusti S., Spadoni I., Clerico A., Biagini A., Andreassi M.G.

CNR, Institute of Clinical Physiology, "G. Pasquinucci" Hospital, Massa, Italy

**Background.** Patients with patent foramen ovale (PFO) are considered to be at higher risk of cerebral ischemic events. Nonetheless, other factors such as genetic ones predisposing to a hypercoagulable state might increase the risk of ischemic events in this set of patients.

**Aim.** To investigate the association between prothrombin (PT)<sub>G20210A</sub> variant and the 677TT genotype of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cerebral ischemia in young patients (<55 years).

**Methods.** We included 65 patients (Group I; 37 male,  $39.6 \pm 9.7$  years) with history of stroke or transient ischemic attack with (n=58) and without (n=7) PFO. The control group (Group II; 27 male,  $37.6 \pm 9.3$  years) consisted of healthy subjects with (n=23) and without (n=62) PFO.

**Results.** No significant association was found in the distribution of the C677T MTHFR genotypes in the 2 groups. By contrast, the PT<sub>G20210A</sub> transition variant was significant more frequent in the Group I with respect to Group II ( $\chi^2 = 4.6$ ;  $p = 0.03$ ). Heterozygosity for the PT<sub>G20210A</sub> variant was more frequent in the PFO+ group with cerebral ischemia compared to PFO+ group without previous cerebral ischemia (CI) or systemic embolism (Table).

	PT <sub>G20210A</sub> variant n (%)	C677T MTHFR genotype, n (%)
<b>PFO<sup>+</sup>/cerebral ischemia</b>	5 (8.6)	15 (25.9)
<b>PFO<sup>+</sup> /no-cerebral ischemia</b>	0 (0)	6 (26.1)
<b>PFO<sup>-</sup>/cerebral ischemia</b>	2 (28.6)	3 (42.9)
<b>PFO<sup>-</sup>/no-cerebral ischemia</b>	2 (3.2)	19 (30.6)

Overall, the G2010A transition increased the relative risk for cerebral ischemia approximately 5-fold compared with the control group [odds ratio 5.0; (95% CI, 1.0-25.0);  $p = 0.03$ ].

**Conclusion.** The PT<sub>G20210A</sub> variant is a risk factor for cerebral ischemia in young patients, suggesting that hypercoagulable disorders may explain the apparent association with PFO and cerebral ischemia.

**039****QUANTITATIVE ANALYSIS OF TYROSINASE mRNA FROM MELANOMA CELLS IN BLOOD BY SINGLE-STEP REAL-TIME PCR**

Savino M., Garrubba M., Lo Muto M., Carella M., Santini S. A.

IRCCS Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", Viale Cappuccini 1, 71013 San Giovanni Rotondo (FG).

Quantification of tumor mRNA markers expressed by occult circulating tumor cells may be of prognostic value in a variety of neoplasms and disease stages. Several studies have evaluated the use of polymerase chain reaction (PCR) amplification of tyrosinase mRNA to detect melanoma cells in blood. However, contradictory results have been obtained from different groups. We describe a single-step real time polymerase chain reaction (PCR) assay to quantify tyrosinase mRNA expressed by melanocytes and melanoma cells, suitable for peripheral blood analysis, using the Light Cycler system.

Up to date, a small number of melanoma patients were evaluated. The peripheral blood was collected in both Pax gene tubes and EDTA-containing vacutainer tubes for each patient and the total RNA was isolated by means of two different techniques: guanidinium thiocyanat/phenol chloroform extraction (Extrazol, Amplimedical SpA, Torino, Italy) and Pax gene blood kit (PreAnalytix, Qiagen, SpA, Milano, Italy). RNA was reverse transcribed using two different approaches: RT-method followed by Nested PCR (Amplimedical spA, Torino, Italy) and Superscript III cDNA synthesis (Invitrogen, srl, Milano, Italy) followed by single step Real Time PCR using primers described by Max N. et al. (2001). Quantitative single step real time PCR was performed using the Light Cycler-FastStart DNA master SYBR Green kit (Roche Applied Science). cDNA input was normalized by the average expression of two housekeeping genes TBP (TATA box-binding protein) and  $\beta$  actin.

Preliminary data show that the results obtained by Nested PCR and by single step real time PCR were concordant suggesting that quantitative RT-PCR analysis for tyrosinase could be an innovative tool for the diagnosis of melanoma micrometastases. Further analysis on additional number of samples will be performed to confirm these results. In particular, since the real time is a more sensitive method for the mRNA quantification, this approach could be useful to detect a small amount of RNA.

**040****IDENTIFICATION OF A NOVEL MISSENSE MUTATION IN THE VMD2 GENE IN AN ITALIAN FAMILY WITH BEST MACULOPATHY**

Passerini I<sup>^</sup>.; Girolami F<sup>^</sup>.; Sodi A<sup>°</sup>.; Relisti V<sup>^</sup>.; Menchini U<sup>°</sup>.; Torricelli F<sup>^</sup>

<sup>°</sup> Eye Clinic, University of Florence, Italy  
<sup>^</sup>SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Florence, Italy

**Background:** Vitelliform macular dystrophy (Best's disease) is an autosomal dominant, early-onset form of macular degeneration in which the primary defect is thought to occur at the level of the retinal pigment epithelium.

VMD2 gene, considered responsible for the disease, codifies for Bestrophin. In the present study we screened for mutations the VMD2 gene in Italian patients with Best maculopathy.

**Methods:** Seven families with Best disease were recruited from central and southern Italy, and family members were evaluated by standard ophthalmologic examination.

All affected patients and some of the unaffected family members had a blood sample drawn, and the DNA was analyzed for mutations in all 11 exons of the VMD2 gene by DHPLC approach and direct sequencing techniques.

**Results:** Some mutations of the VMD2 gene have been detected in all the affected patients and in some unaffected relatives. A novel mutation (R218G) was detected; it involves an aminoacid which has been reported to be highly conserved across different species and it is probably located in a protein region serving as a site of attachment or an active site for an enzyme. In this series the same mutation was associated with some differences in clinical phenotypes; in fact in one family the R218C mutation was associated with the onset of choroidal neovascularization (CNV) in the affected mother and her son, while no CNV was reported in another family sharing the same mutation. Another family with the R25W mutation showed a multifocal location of the vitelliform deposits, while another family with the same mutation showed a typical isolated vitelliform disc in the macular area.

**Conclusions:** Some mutations of VMD2 gene have been detected in some Best's disease families; among them there is a novel mutation probably involving a functionally active region of the bestrophin protein. In spite of the small number of studied families it was possible to remark a certain phenotype heterogeneity.

**041****TECNOLOGIA MICROARRAY PER LO STUDIO DI PAZIENTI AFFETTI DA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA**

Nannetti G.; Marsegli G.; Magi A.; Ermini C.; Betti M.; Girolami F.; Olivotto I.♣; Cecchi F. ♣; Torricelli F.

SOD Diagnostica Genetica AOU Careggi Firenze

♣Centro Riferimento Regionale per le malattie del miocardio AOU Careggi Firenze

La Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI) viene definita come una malattia primitiva del miocardio caratterizzata da ipertrofia del ventricolo sinistro, diffusa o segmentaria, raramente estesa anche al ventricolo destro. I recenti progressi nel campo della genomica forniscono oggi l'opportunità di analizzare in maggior dettaglio le modificazioni molecolari associate a varie malattie ad alto impatto sociale come l'ipertrofia cardiaca. L'analisi microarray si candida a questo proposito come tecnologia innovativa in grado di valutare l'espressione di migliaia di geni in un singolo esperimento. Lo studio di espressione di 14.000 geni mediante tecnologia Stanford è stato condotto su 5 soggetti affetti da cardiomiopatia ipertrofica, precedentemente caratterizzati geneticamente, al fine di esplorare i meccanismi di espressione genica della patologia in esame sull'intero pannello di geni presenti sull'array. In particolare, per ciascun campione viene estratto l'RNA totale dalla biopsia e viene confrontato con un pool RNA utilizzato come controllo. Per entrambi viene eseguita l'amplificazione dell'RNA messaggero in modo da ottenere la quantità di mRNA sufficiente per eseguire l'intero disegno sperimentale. L'mRNA viene quindi sottoposto a trascrizione inversa, marcato in modo differenziale e coibridato sull'array. La quantificazione dei livelli di espressione genica è basata sulla valutazione dei rapporti delle fluorescenze emessa dai due fluorofori. Dall'analisi dei 5 campioni fino ad ora esaminati circa 400 geni risultano differenzialmente espressi. L'ampliamento della casistica permetterà di selezionare quelli funzionalmente rilevanti nella condizione sperimentale esaminata. La validazione dei dati sarà eseguita mediante real time PCR.

**042****ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI PML-RAR $\alpha$ , hTERT E FLT3 NELLA LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA (LAP) IN RICADUTA**

Calatroni S., Bernasconi P., Rocca B., Lugano E., Boni M., Castagnola C., Cavigliano P.M., Giardini I., Zappatore R., Caresana M., Quarna J., Astori C., Lazzarino M.

Divisione di Ematologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il riarrangiamento PML-RAR $\alpha$ , individuabile mediante PCR, è il marcatore molecolare della Leucemia Acuta Promielocitica (LAP) e viene utilizzato per il monitoraggio della malattia minima residua in seguito a trattamento con Acido Retinoico (ATRA). Il presente studio si propone di valutare l'eventuale utilità di altri fattori nell'individuare pazienti a rischio di recidiva. I geni presi in considerazione sono stati FLT3 e hTERT. Nella LAP, FLT3 può essere soggetto a duplicazioni interne in tandem (ITD), associate a prognosi sfavorevole ed incremento di espressione. Il gene hTERT codifica per la subunità catalitica della telomerasi, proteina coinvolta nell'allungamento dei telomeri e nei processi di immortalizzazione delle cellule tumorali.

Sono stati analizzati 4 pazienti con almeno una ricaduta e 1 in remissione clinica e molecolare. L'analisi è stata condotta su 80 campioni di RNA totale, isolati da cellule mononucleate di midollo osseo o sangue periferico, e sottoposti a retrotrascrizione e RT-PCR per PML-RAR $\alpha$  e ITD di FLT3. La quantificazione relativa dei trascritti PML-RAR $\alpha$  (isoforme BCR1 e BCR3), FLT3 e hTERT è stata eseguita mediante real-time PCR usando SybrGreen Master Mix (Applied Biosystems) e oligo specifici.<sup>1</sup> L'espressione di ABL è stata usata per normalizzare quella dei geni target. L'efficienza di amplificazione (98-99%) e la sensibilità di ciascuno saggio ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ) sono state valutate mediante analisi delle curve standard di diluizioni seriali di RNA di campioni con elevata espressione del gene studiato. I livelli di espressione sono stati calcolati mediante il metodo  $\Delta\Delta C_t$  e sono stati espressi come numero di volte rispetto al campione calibratore. La specificità di ogni saggio è stata dimostrata dall'analisi delle curve di dissociazione. L'espressione di FLT3 e hTERT è stata valutata anche in un gruppo di controllo di 10 campioni non patologici.

In tutti i pazienti ricaduti, i livelli di PML-RAR $\alpha$ , come atteso, aumentano in corrispondenza delle ricadute. Inoltre, ITD di FLT3 sono presenti in almeno due prelievi e le variazioni dell'espressione di PML-RAR $\alpha$  e FLT3 seguono un andamento simile; tuttavia livelli elevati di FLT3 non sempre corrispondono alla comparsa di mutazioni. Incrementi nei livelli di hTERT sembrano precedere o accompagnare gli aumenti rilevabili nell'espressione di PML-RAR $\alpha$  e FLT3. Il paziente in remissione clinica e molecolare, alla diagnosi, presenta livelli elevati di FLT3 che diminuiscono con la riduzione di PML-RAR $\alpha$  e che non si associano a ITD; durante il monitoraggio i livelli di hTERT e FLT3 sono bassi. Un numero maggiore di pazienti è tuttavia necessario per confermare queste osservazioni.

**043**

## IVS14+1G&gt;A MUTATION AND 5-FLUOROURACIL TOXICITY

\*Betteto S., \*Priolo G., \*Ferrero E. #Volpatto R., #Bertetto O.

\*Laboratorio Chimica Clinica "Baldi e Riberi", #C.O.E.S. (Centro Oncologico ed Ematologico Subalpino), A.S.O. San Giovanni Battista - Torino

The IVS14+1G>A mutation in *DPYD* gene encoding for dehydroypyrimidine dehydrogenase (DPD) is increasingly being recognised as a genetic factor predisposing patients to the development of severe 5-fluorouracil (5-FU) toxicity. 5-FU is the most common chemotherapeutic agent used as adjuvant treatment in colorectal cancer. DPD is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of 5-FU. Patients with a partial deficiency of DPD are at risk of developing severe 5-FU toxicity. In our study we detected the splice-site mutation IVS14+1G>A leading to the skipping of exon 14 in the process of DPD pre-mRNA splicing. We evaluated 102 patients (59 males and 43 females, median age 62.1 years) with radically resected colorectal carcinoma, treated with 5-FU. Genetic analysis of the *DPYD* gene through PCR and reverse-hybridization techniques allowed us to identify the presence of mutation in 18 cases (17%). Our genotyping test showed that all identified mutations were heterozigotes. DPD enzymatic deficiency was associated with two types of toxicity: low toxicity, including haematological, gastrointestinal and flu-like symptoms (grade G1-G2), and high toxicity related to life-threatening complications, from mucositis and fourth grade neutropenia to coma and death (grade G3-G5). We found a significant correlation between the presence of mutation and mucositis or fourth grade neutropenia ( $X^2=70.60$  and  $X^2=56.49$ , respectively) in patients with G3-G4 toxicity. According to our data a 93% probability of severe toxicity should be considered in patients with the IVS14+1G>A mutation, also taking into account the expected prevalence of toxicity in the absence of this mutation. Our results demonstrated that the screening for IVS14+1G>A mutation in patients before starting 5-FU adjuvant chemotherapy might avoid severe toxicity including diarrhea, stomatitis, mucositis, neutropenia and in some cases life-threatening complications. Moreover, the identification of patients with DPD deficiency may guide the choice of alternative treatment strategies.

van Kuilenburg A.B.P. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004, **40**, 939-950.

**044**

## LA FETUINA NEI PAZIENTI IN DIALISI: TRA CALCIFICAZIONE VASCOLARE E MICROINFIAMMAZIONE.

Turri O.\*, La Torre A.\*, Cozzolino M.\*\*, Erario M, Battaglioli L\*, Melzi d'Eril GV\*\*\*, Biondi ML\*

\*Laboratorio Analisi Chimica Clinica e Microbiologia, \*\* Divisione di Nefrologia \*\*\*Dip Med e Chir, Univ degli Studi di Milano Azienda Ospedaliera S. Paolo, Milano.

Le calcificazioni vascolari (CV) hanno un ruolo chiave nella morbilità e mortalità dei pazienti dializzati. La Fetuina A è una proteina anti infiammatoria che inibisce la deposizione di calcio-fosfato e una sua carenza è stata associata ad una maggiore mortalità per cause cardiovascolari. Per meglio definire un suo ruolo, sia biochimico che genetico, abbiamo studiato 115 pazienti (59,1% uomini; età media 66 anni) in dialisi e 48 controlli. Nei pazienti è stata valutata l'associazione tra la presenza di calcificazioni, i livelli di Fetuina e delle proteine di fase acuta, il polimorfismo T256S (C→G) (a) con i tradizionali fattori di rischio cardiovascolare. La presenza o assenza di CV è stata valutata in 7 distretti vascolari (carotide dx e sin, valvola mitralica ed aortica, aorta addominale, arteria femorale dx e sin) ed è stato assegnato uno *score* da 0 a 7. Il dosaggio della fetuina sierica è stato effettuato con kit ELISA (Li Star FISH, Carugate, Italia) e il DNA, estratto da sangue intero, è stato amplificato con primers specifici e quindi digerito con enzima di restrizione Sac I. L'analisi univariata ha dimostrato una associazione negativa tra i livelli sierici di Fetuina A ( $p=0.014$ ) e albumina ( $p<0.001$ ) e una associazione positiva con quelli di Proteina C reattiva ( $p=0.001$ ) e fibrinogeno ( $p<0.001$ ). L'età anagrafica e dialitica, il diabete, il fumo e i livelli sierici di PTH erano associati in modo indipendente ad un alto score.

Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra la distribuzione genotipica in pazienti e controlli, e nessuna differenza è stata trovata nella distribuzione genotipica sia con i controlli che con lo score vascolare. Nei pazienti, la presenza di almeno un allele G mutato (GG+GC vs CC) correlava con livelli sierici di fetuina più bassi ( $p=0.041$ ).

In conclusione: 1) le calcificazioni vascolari risultano associate a una condizione microinfiammatoria cronica 2) il deficit di Fetuina A correla con uno score maggiore indipendentemente dai tradizionali fattori di rischio cardiovascolare. 3) l'assetto genico sembra influenzare i livelli di fetuina, ma non le manifestazioni cliniche.

a) Stenvinkel P. et al. "Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: impact of variations in the gene encoding fetuin."

*Kidney International*, Vol. 67 (2005), pp.2383-2392

## 045

## GLUTATHIONE S-TRANSFERASES AND APOE AS SUSCEPTIBILITY GENES FOR LATE-ONSET ALZHEIMER DISEASE

<sup>1</sup>Bellincampi L., <sup>1</sup>Bernardini S., <sup>1</sup>Ballerini S., <sup>1</sup>Infantino M., <sup>1</sup>Iori R., <sup>1</sup>Rapanotti C., <sup>1</sup>Valentini A., <sup>2</sup>Bossù P., <sup>2,3</sup>Caltagirone C., <sup>2,3</sup>Spalletta G., and <sup>1,4</sup>Federici G.

<sup>1</sup>Dept. of Internal Medicine-PTV, University of Rome "Tor Vergata", <sup>2</sup>IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome, <sup>3</sup>Dept. of Neuroscience, University of Rome "Tor Vergata", Rome, <sup>4</sup>Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Rome.

**Background:** Oxidative stress and neuronal cell death have been implicated in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD). Considering that the Glutathione transferase (*GST*) supergene family encodes isoenzymes that appear to be critical in the protection against oxidative stress, we aimed at determining the various *GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and *ApoE* genotypes in order to investigate their role as susceptibility genes for late-onset AD (LOAD).

**Methods:** We included 210 LOAD and 228 healthy controls matched for age, sex and educational level in our case-control genetic association study. *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were studied by conventional PCR, whereas *GSTP1* and *ApoE* genotypes were determined by real time PCR with Light Cycler.

**Results:** We found a significant association between LOAD and the *GSTP1* \*C allelic variant [Odds ratio (OR)=1.9; p<0.05], but no association between the *GSTM1* and *GSTT1* deleted genotypes and LOAD. In addition, a preliminary result suggests that carriers of both the *GSTP1* \*C and *ApoE* ε4 allelic variants were at further increased risk of LOAD [Odds ratio (OR)=19.98; p<0.0001].

**Conclusions:** The *GSTP1* \*C allelic variant should be considered as a candidate for LOAD, particularly in persons having the *ApoE* ε4 allelic variant, because the *GSTP1* and *ApoE* gene products are implicated in oxidative stress and apoptosis processes leading to β -amyloid-mediated neurodegeneration.

1) S.Bernardini et al., Clin. Chem. 51:6, 944-951. 2005.

## 046

## THE HOMOZYGOUS MICA 5.1 GENOTYPE IS ASSOCIATED WITH ATYPICAL FORMS OF CELIAC DISEASE IN ADULTS

Sacchetti L.<sup>1,2</sup>, Calcagno G.<sup>1,2</sup>, Tinto N.<sup>1,2</sup>, Gennarelli D.<sup>1,2</sup>, Spampanato A.<sup>1,2</sup>, Tortora R.<sup>3</sup>, Ciacci C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, via S. Pansini 5, 80131 Napoli; <sup>2</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate via Comunale Margherita 482, 80145 Napoli; and <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Università di Napoli Federico II, via S. Pansini 5, 80131 Napoli, Italy

**Background & aim.** Coeliac disease (CD) is a multifactorial condition affecting about 1:100 people in western Europe, but the prevalence is much higher in such high risk groups as relatives of CD patients, and patients with diabetes mellitus, anemia, osteoporosis, etc. (1). The symptoms of CD are diverse, and the disease often goes undiagnosed when the patient is asymptomatic or displays atypical signs. Consequently, laboratory tests that identify also atypical CD are particularly important. Of the genetic tests available, HLA predisposition plays a relevant role because DQ2/DQ8 molecules are present in more than 95% of CD patients. However, HLA typing does not discriminate between typical and atypical forms of the disease. The aim of this study was to investigate whether MICA (an MHC class I gene) polymorphisms in CD adult patients are associated with atypical forms of CD.

**Methods.** MICA polymorphisms were investigated in 108 healthy controls, and in 86 typical and 105 atypical adult CD patients, recruited from the Department of Medicina Clinica e Sperimentale (patients), and from the Outpatients Section of Laboratory Medicine (controls). All individuals enrolled in the study gave their informed consent, and had previously been tested for HLA susceptibility loci and for TTG antibodies.

**Results.** The distribution of DQ2 did not differ between the typical and atypical CD groups. The MICA 5.1 allele was more frequent in CD patients versus controls ( $p<0.001$ ), and MICA 5.1 homozygotes were more frequent in the atypical than in the typical CD group ( $p<0.05$ ).

**Conclusion.** CD signs in adult patients are very variable and the atypical forms, which often lack gastrointestinal manifestations, are underdiagnosed. Our data implicate MICA 5.1 in CD susceptibility, and suggest it could play a role in the atypical forms of the disease, particularly when present at homozygote level. In fact, it has been suggested that, by blocking enterocyte recognition and destruction by activated T cells, MICA 5.1 could prevent typical CD and so predispose to atypical forms (2).

1)Murray J.A. et al. Gastroenterology (2005) 128, 552-6.

2)Lopez-Vazquez A. et al Am J Gastroenterol (2004) 99, 662-7.

Acknowledgments: Work supported by grants from CEINGE Regione Campania (Convenzione del G.R. 27/12/2002 N° 6276), and Regione Campania PF Ricerca Sanitaria DG 10 del 21/01/2005.

**047****METABOLISMO DELLA METIONINA: DUPLICE RUOLO NELLA CARDIOPATIA ISCHEMICA?**

Venturi C<sup>1</sup>, Colivicchi M.A.<sup>2</sup>, Fattori M.<sup>2</sup>, Della Corte L.<sup>2</sup>, Vergoni W.<sup>1</sup>, Bianchi L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Via C. Battisti 2, 51017 Pescia (PT); <sup>2</sup>Dipartimento di Farmacologia PreClinica e Clinica, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze.

Tra i metaboliti della metionina due sembrano avere un ruolo nella ischemia miocardica: 1) l'omocisteina (HCY) come fattore di rischio; 2) la taurina (TAU) come fattore protettivo nel danno da ripercussione (1). Obiettivi. Scopo del nostro studio è valutare se le mutazioni più frequenti dell'enzima N-5,10-metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR), regolatore del ciclo della metionina, sono coinvolte nella variazione dei livelli plasmatici di TAU, oltre che di HCY e se correlano con la presenza e/o gravità di cardiopatia ischemica (CAD).

Metodi. In una popolazione di 105 pazienti affetti da CAD ed in una di 90 pazienti sani di controllo, sovrapponibili per età, distribuzione fra i sessi ed incidenza dei fattori di rischio tradizionali, sono stati determinati: i livelli di TAU con un metodo di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e rilevazione fluorimetrica, i livelli di HCY con metodo immunologico a fluorescenza con luce polarizzata, (FPIA, Abbott), e le due mutazioni dell'enzima MTHFR, la C677T con reazione a catena della polimerasi (PCR) ed impiego dell'enzima di restrizione, HinfI (Diatech) e la A1298C con "Real Time" PCR ed analisi delle curve di melting (Rotor gene, Diatech). La gravità della malattia coronaria è stata definita utilizzando il Gensini Cardio Score (GCS)

**Risultati.** 1) La mutazione C677T non influenza i livelli plasmatici di TAU mentre risulta significativamente correlata ai livelli di HCY ( $p < 0.01$ , Anova-Bonferroni). Non è rilevabile alcuna correlazione con la presenza o gravità di CAD; 2) la mutazione A1298C risulta significativamente correlata alla diminuzione dei livelli plasmatici di TAU ( $p < 0,05$ , Anova-Bonferroni) e non correla con i livelli di HCY. Inoltre correla con la gravità ( $p < 0,05$ , Anova-Bonferroni) ma non con presenza di CAD.

**Conclusioni.** I dati riportati indicano che: 1) la mutazione A1298C è coinvolta nel metabolismo della TAU e la mutazione C677T con il metabolismo della HCY; 2) la ipotaurinemia e l'iperHCY correlano con la gravità di CAD; 3) il metabolismo della metionina sembra avere un duplice ruolo patogenetico/protettivo nell'ischemia miocardica.

**Bibliografia.** Chang L., Zhao J., Xu J., Jiang W., Tang CS, Qi YF. Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria. Clin Exp Pharmacol Physiol 2004; 31(4):237-243.

**048****IL RUOLO DEI POLIMORFISMI RANTES - 403G/A E SDF-1 3'A-UTR NELL'INFARTO MIOCARDICO ACUTO GIOVANILE.**

\*Sini M.E., °Partenza A., °Barca M., #Mureddu G., #Pilo P., \*Pes G.M., #Maoddi I., \*Carru C., \*Deiana L.  
\*Dip. Scienze Biomediche - Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Sassari; °Laboratorio Analisi "Zonchello", ASL n°3 Nuoro; ^UTIC, ASL n° 3 Nuoro

RANTES è uno dei ligandi naturali per il recettore delle chemochine CCR5 coinvolto non solo come mediatore dell'infiammazione ma interviene come regolatore nello sviluppo e la differenziazione tissutale. L'SDF-1 è una piccola citochina attivante i linfociti indotta da uno stimolo proinfiammatorio e sembra svolgere un ruolo importante nella rigenerazione del miocardio. In questo studio sono stati investigati lo SNP RANTES - 403 G/A nella regione promotrice nel cromosoma 17 e lo SNP in UTR 3'A di SDF-1 per valutare un loro coinvolgimento nella patologia dell'infarto giovanile.

**Obiettivo:** lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare i due polimorfismi in una popolazione di 71 giovani infartuati della provincia di Nuoro (M= 61, F= 10; età media  $45,2 \pm 4,2$ ), con evento infartuale da 3 a 12 mesi prima dello studio, confrontati con una popolazione di controlli costituiti da 135 soggetti selezionati random fra la popolazione sarda.

**Materiali e metodi:** il polimorfismo - 403 G/A di RANTES è stato determinato mediante PCR seguita da RFLP con l'enzima RSA I, in gel misto agaroso/metaphor® colorato con bromuro di etidio. Il polimorfismo in UTR 3'A di SDF-1 veniva determinato mediante PCR seguita da RFLP dell'enzima Msp I.

**Risultati:** Entrambe le popolazioni seguono l'equilibrio di Hardy Weinberg. La distribuzione dei genotipi era la seguente:

**RANTES: -403 G/A  
FREQUENZE ALLELICHE**

	Pazienti	Controlli		Pazienti	Controlli
GG	66,67%	69,87%	G	0,815	0,828
GA	29,83%	26,03%	A	0,185	0,172
AA	3,5%	4,10%			

Il confronto fra le due popolazioni con  $p < 0,005$  ha evidenziato che le differenze non sono statisticamente significative

**SDF-1 : UTR 3'A****FREQUENZE**

	Pazienti	Controlli		Pazienti	Controlli
GG	49,65%	58,54%	G	0,646	0,762
GA	30,24%	33,56%	A	0,354	0,238
AA	20,1%	6,1%			

L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa fra le due popolazioni nella distribuzione del genotipo AA: chi-quadro 8.12, chi-quadro (corretto Yate) 6.92, odds ratio 3.95.

**Conclusioni:** I dati da noi rilevati dimostrano una significativa associazione del genotipo AA di SDF-1 con l'insorgenza dell'infarto del miocardio in età giovanile. Ulteriori approfondimenti sono al momento in corso.

**Bibliografia:** Askari, A. T. Lancet; (2003); 362: 697-703.

## 049

APPLICAZIONE DELLA REAL-TIME PCR  
NELLA DIAGNOSI DI GIARDIA DUODENALIS

Valentini A.\*, Berrilli F.\*<sup>^</sup>, Di Cave D.\*<sup>^</sup>, Iori R.\*, D'Orazi C.\*, Bellincampi L.\*, Bernardini S.\* and Federici G.\*

\*Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, <sup>^</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università Tor Vergata, Roma.

L'infezione da *Giardia duodenalis* è ritenuta una parassitosi emergente nei paesi industrializzati ed è fra le cause più frequenti di diarrea. Attualmente la diagnosi è eseguita evidenziando nelle feci le cisti, attraverso microscopia ottica e a fluorescenza e test ELISA. Le cisti sono facilmente rinvenute nelle infezioni acute e sintomatiche, ma l'eliminazione del parassita è intermittente e si presenta a bassi livelli nelle infezioni croniche. Inoltre, l'infezione può decorrere anche in maniera asintomatica e in questo caso solo saltuariamente è possibile individuare le cisti.

**Obiettivo:** Tecniche molecolari (PCR) più sofisticate permettono una maggiore sensibilità rispetto ai test diagnostici in uso (1), soprattutto nell'evidenziazione dei parassiti nelle situazioni dubbie e asintomatiche. Il nostro obiettivo è stato quello di applicare tecniche di PCR basate su fluorescenza (real-Time PCR) per ottenere un test diagnostico di *Giardia* più rapido, sensibile e specifico rispetto alla microscopia.

**Metodologie:** Nel nostro studio abbiamo messo a confronto la microscopia ottica e la real-Time PCR (LightCycler-Roche) utilizzando sonde (FRET) sintetizzate sul gene 16-rRNA, abbiamo verificato la sensibilità della nuova metodica molecolare e valutato la concordanza assoluta fra le due metodiche (test K).

**Conclusioni:** Sono stati esaminati 86 soggetti sia adulti sia in età pediatrica. Su tutti i casi sono state effettuate osservazione microscopica, PCR e real-Time PCR. Attraverso l'analisi del test statistico K (test di Cohen), che rappresenta un indice di concordanza assoluta tra due diverse metodiche, abbiamo riscontrato una bassa concordanza (0,475) fra la metodica di routine (microscopia) e la real-Time PCR, dovuta probabilmente all'alta percentuale di falsi negativi della microscopia e all'alta sensibilità della real-Time PCR (96%). Questo studio fa presupporre che l'utilizzo della real-Time PCR nella diagnosi di *Giardia* è sicuramente più sensibile, specifico oltretutto di rapida esecuzione. E' attualmente in fase di studio la concordanza fra la real-Time PCR e la PCR convenzionale.

1) C.F.L. Amar et al. Eur J Microbiol Infect Dis, 2004, 23: 529-534

## 050

DETECTION OF mtDNA WITH 4977bp  
DELETION IN BLOOD CELLS AND  
ATHEROSCLEROTIC LESIONS OF PATIENTS  
WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Botto N., Manfredi S., Federici C., Berti S., Rizza A., Clerico A., Ciofini E., Biagini A., Andreassi M.G. CNR, Institute of Clinical Physiology, "G. Pasquinucci" Hospital, Massa, Italy

**Background.** Recent evidence suggests that somatic mutations in nuclear and mitochondrial DNA accumulated during aging, may significantly contribute to the pathogenesis of chronic-degenerative illness such as coronary artery disease (CAD). Mitochondrial DNA with 4977 bp deletion mutation (mtDNA 4977) is a common type of mtDNA alteration in humans. However, little attempt has been made to detect the presence of mtDNA 4977 deletion in cells and tissues of cardiovascular patients.

**Aim.** This study investigated the presence of mtDNA 4977 in blood samples of 65 cardiovascular patients and 23 atherosclerotic plaques of human coronaries with severe atherosclerosis. Moreover, the presence of the deletion has been investigated in blood cells from 22 healthy age-matched subjects.

**Methods.** The detection of mtDNA 4977 has been performed by using a nested polymerase chain reaction (PCR) protocol and normalized to wild-type mtDNA.

**Results.** A significant higher incidence of mtDNA 4977 was observed in CAD patients with respect to healthy subjects (26.2% versus 4.5%; P = 0.03). Furthermore, the relative amount of the deletion was significantly higher in the patients compared to the control group (P = 0.02). The mtDNA 4977 was detected in 17 of the 65 patients blood samples (26.2%) and deletion levels ranged from 0.18 to 0.46% of the total mtDNA (mean: 0.34 ± 0.02%). For what concerns atherosclerotic lesions, 5 patients (21.7%) showed the deletion ranging from 0.13 to 0.45% of the total mtDNA (mean: 0.35 ± 0.06%). In both samples from patients, the incidence and the relative amount of mtDNA 4977 was not significantly influenced by atherogenic risk factors and clinical parameters.

**Conclusions.** The obtained results may suggest that the increase of oxidative stress in cardiovascular disease may be responsible for the accumulation of mtDNA damage in coronary artery disease patients.

## 051

### UTILITA' PROGNOSTICA DELL'HCV RNA QUANTITATIVO DOPO TRAPIANTO ORTOTOPICO DI FEGATO IN PAZIENTI AFFETTI DA EPATOPATIA HCV CORRELATA.

Nisi L, Tomasicchio L Ricci P\*; Pansini N.  
Unità Operativa Patologia Clinica I Azienda Ospedaliera "Policlinico" Bari  
\* Facoltà di Scienze del Benessere. Università degli Studi del Molise.

**Premessa.** Il trapianto ortotopico di fegato (OLT) rappresenta il gold standard terapeutico nei pazienti affetti da cirrosi scompensata e/o epatocarcinoma. La principale complicanza dell'OLT per malattia ad eziologia virale è rappresentata dalla reinfezione del nuovo organo. L'inizio della terapia antivirale nel post trapianto implica una serie di problematiche legate alla fase di immunosoppressione in cui si presenta il paziente e agli effetti collaterali dei farmaci antivirali. Tuttavia un inizio di terapia tardivo può mettere a rischio la funzionalità del fegato impiantato per l'instaurarsi di forme di epatocitolisi acute e/o subacute. E' pertanto importante il riscontro di parametri di ausilio alla scelta del momento terapeutico. Il dosaggio delle ALT si è dimostrato inefficace. Nei pazienti affetti da malattia HCV correlata sono stati proposti protocolli di terapia precoce con interferone associato alla ribavirina. Allo scopo di individuare un fattore bioumorale in grado di identificare il momento più idoneo per l'inizio della terapia antivirale abbiamo effettuato determinazioni sieriche dell'HCV RNA quantitativo nella fase post-OLT.

**Materiali e metodi** In un periodo di otto mesi sono stati studiati 10 pazienti (8 maschi e 2 donne) di età media 48 anni sottoposti a OLT per cirrosi HCV correlata. Per tali pazienti, oltre alle indagini biochimiche di routine, è stata eseguita la determinazione dell'HCV RNA quantitativo su siero con metodica b-DNA (Quantiplex™ 3.0 Assay Technology Bayer Corporation, Tarrytown NY USA) con modalità seriata (gg 0-15-30-45-60-90). E' stata, inoltre, effettuata correlazione tra i livelli sierici di HCV RNA ed indici di epatocitolisi, nonché tra tali parametri di laboratorio ed inizio di terapia antivirale allo scopo di individuare un eventuale cutt-off che possa indicare al clinico il momento più opportuno per l'inizio della terapia antivirale.

**Risultati** Nei 10 pazienti studiati, abbiamo riscontrato bassi livelli di viremia al momento del trapianto con incremento nei giorni successivi. In tutti i pazienti, nel momento in cui venivano sottoposti ad idoneo trattamento antivirale, abbiamo osservato un abbassamento dei livelli di viremia ed una riduzione degli indici di epatocitolisi. Soltanto in due dei dieci pazienti l'alta viremia correlava con elevati livelli di ALT, entrambi non avevano ancora iniziato il trattamento antivirale. L'inizio della terapia antivirale ha mostrato in entrambi i pazienti un abbassamento della viremia e degli indici di epatocitolisi (ALT). In 1/10 pazienti un prematuro stop terapeutico, per ritiro del consenso, ha determinato un incremento della carica virale e di ALT.

**Conclusioni.** I nostri dati indicano che il dosaggio quantitativo dell'HCV RNA può rappresentare un

utile parametro predittivo di evoluzione della malattia epatitica, infatti essi evidenziano che la determinazione dell'HCV RNA quantitativo rappresenta un utile parametro indicativo di inizio della terapia. L'introduzione della terapia all'incremento dell'HCV RNA risulta precoce rispetto all'evidenza di indici di epatocitolisi e mostra maggiore successo sul controllo della malattia. L'incremento numerico del campione oggetto dello studio potrebbe evidenziare un cutt-off virologico utile per l'inizio del trattamento terapeutico.

**052****LA PROTEINA C ANTICOAGULANTE NEL TRATTAMENTO DELLA SEPSI GRAVE IN PAZIENTI PEDIATRICI**

Soldati M., Pancotti S., Bececco S., \*Marano M., \*Tomasello C.,

Dip. dei Laboratori, \*Dip. Emergenza-Rianimazione Ospedale Bambino Gesù IRCCS, Pz. S. Onofrio 4, 00165 Roma

**Obiettivi:** Ci siamo proposti di controllare l'efficacia della terapia farmacologica con concentrati di proteina C (PC) in pazienti con sepsi grave, verificando:

- 1.) l'andamento degli indici della sepsi (PCR, WBC, T°C, PLT);
- 2.) il ripristino della normale attività coagulativa (test di base, proteina C/S anticoagulante, D-Dimero, PAI 1 e Trombomodulina;
- 3.) la relazione esistente tra livelli di PC e le citochine della flogosi (TNF- $\alpha$ , IL1, IL6, IL10).

Controllando, inoltre, l'andamento clinico e la stabilizzazione dell'emodinamica.

**Materiali e metodi:** Abbiamo studiato 10 bambini affetti da sepsi grave, con fascia di età compresa tra il neonato a termine e l'adolescente, con infezione acuta sospetta o provata. Escludendo pazienti affetti da epatopatia acuta e/o cronica, pz < 38 settimana EG, pz con deficit congenito di proteina C. In ogni paziente venivano dosati a T0 (prelievo basale senza terapia) e T n (prelievi successivi con terapia) i seguenti parametri: dosaggio della APC-R, Proteina C/S, D-Dimero, coagulazione di base (coagulometro STA-R ROCHE) chimica e PCR (analizzatore Modular ROCHE), emocromo (analizzatore ADVIA 120, Bayer), citochine, PAI-1, trombomodulina. A Tn gli indici della flogosi vengono dosati ogni 24 ore per 4 giorni successivi, PC emocromo e coagulazione basale ogni 12 ore.

**Risultati:** In tutti i pazienti si è ottenuta una significativa diminuzione della risposta infiammatoria, e lo scioglimento dei piccoli coaguli che si formano nei vari organi che sono una delle cause più importanti del loro mal funzionamento; la terapia con concentrati di proteina C è stata in grado di ridurre la mortalità in pazienti con shock settico.

**Conclusioni:** Il trattamento fornisce un temporaneo ma immediato aumento dei livelli plasmatici di PC. Ci si attende che il trattamento sostitutivo di Proteina C in pazienti pediatriche con deficit della proteina C possa controllare o prevenire - in via profilattica - le complicanze trombotiche, e migliorare l'outcome del paziente stesso.

Bibliografia: L. Gattinoni, F. Vagginelli, P. Taccone, E. Bertoja "Sepsi oggi nuove conoscenze prospettive terapeutiche", Minerva anesthesiologia Vol.69-2003.

Fischer CJ, Yan SB: "Protein C levels as prognostic indicator of outcomes in sepsis and related diseases "Crit Care Med" 1999,27:2849-2850

**053****ASSOCIAZIONE aPTT NORMALE E CARENZA FATTORIALE: CRITICITA' NELLA SCELTA DEI REAGENTI**

P. Pergolini, R. Portalupi, A. Appiani, R. Serino, R. Rolla, G. Bellomo  
S.C.D.U. L.R.C.C. "Az. Osp. Maggiore della Carità" Novara

**Scopo della ricerca:** Viene descritto un caso esemplificativo di come la scelta dei reagenti sia critica nel riscontro di carenze fattoriali associate a aPTT normale

**Metodologia:** Per il dosaggio del aPTT è stato utilizzato Actin FS (DADE), composto da fosfatidi di soia liquidi purificati, con acido ellagico come attivatore

Nello screening LAC sono stati utilizzati: 1) Actin FSL (DADE), composto da fosfatidi di soia e da cervello di coniglio liquidi purificati, con acido ellagico come attivatore; 2) test di screening e conferma basato sul tempo di veleno di vipera Russell (LA1/LA2:dRVVT).

Per il dosaggio dei fattori, oltre ai plasmi carenti, è stato utilizzato il reagente Actin FSL, come suggerito dalla Ditta produttrice.

**Risultati:** Pz. femmina, aa. 73, con diabete di tipo II in terapia con antidiabetici orali, con anamnesi familiare e personale negativa per episodi sia trombotici che emorragici, esegue alcuni test di laboratorio pre-operatori (varici venose):

Hb 13.0

PLT 175.000

PT-INR 0.97 PTT 27.7 s Ratio 1.01 Fib. 275 mg/dL

PTT-LA 51.7 s Ratio 1.78

Mix PTT-LA 44.2 s Ratio 1.52

LA1 (dRVVT screening) 61.7 s LA2 (dRVVT conferma) 32.4 s Ratio 1.9

FVIII 27.5 %

FIX 30.9 %

FXI 17.3 %

FXII 33.0 %

Anticorpi antifosfolipidi (ACL,  $\beta_2$  GLI1, AP) nella norma.

La ricerca LAC eseguita dopo circa otto settimane ha confermato la positività:

PTT-LA 58.1 s Ratio 2.0

LA1 (dRVVT screening) 53.8 s LA2 (dRVVT conferma) 31.5 s Ratio 1.71

L'assenza di anemia e di episodi emorragici, la positività ai LAC, confermata anche dal Mix, suggerisce la presenza di Ab antifosfolipidi interagenti con i fosfolipidi contenuti nell'Actin FSL, reagente indicato dalla ditta per il dosaggio dei fattori della via intrinseca. Il successivo dosaggio degli stessi eseguito con Actin FS ha dato i seguenti risultati: FVIII 155.6 %, FIX 68.9 %, FXI 71.9 %.

Non sono stati evidenziati episodi emorragici a seguito di intervento chirurgico.

**Conclusioni:** Sia Actin FS che Actin FSL dovrebbero essere utilizzati contemporaneamente per il dosaggio dei fattori della coagulazione per identificare la presenza di inibitori specifici e/o aspecifici e per una corretta interpretazione della loro rilevanza.

**054****MODULAZIONE IONICA DELLA CASCATA COAGULATIVA**

Romitelli F.<sup>1</sup>, De Simone A.<sup>1</sup>, De Cristofaro R.<sup>2</sup>, Giardina B.<sup>1</sup> e Di Stasio E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. Biochimica e Biochimica Clinica e <sup>2</sup>Istituto di Med. Interna e Geriatria - Centro di Ricerche sull'Emostasi - Università Cattolica del Sacro Cuore - Largo F. Vito 1, 00168 - Roma

La modulazione ionica della cascata coagulativa è argomento di crescente interesse per la comprensione degli eventi molecolari, e delle possibili implicazioni terapeutiche, alla base delle patologie trombotico-emorragiche. In particolare, nel corso di esperimenti svolti su sistemi purificati, è stata dimostrata un'attivazione sodio-dipendente dei fattori VIIa, IXa, Xa e trombina ed un effetto regolatorio dei cloruri sulla struttura del clot di fibrina. Scopo del presente lavoro è verificare il ruolo di tali ioni sull'attivazione della cascata coagulativa e successiva formazione del coagulo di fibrina su plasma intero, ove molteplici componenti possono influenzare la modulazione del processo. La cinetica di attivazione trombinica (APTT), e la successiva formazione del clot di fibrina, è stata analizzata mediante turbidimetria ( $\lambda=350$  nm) su campioni plasmatici di soggetti sani, in presenza di differenti sali in cui variavano sia le componenti anioniche che cationiche. La curva di formazione del coagulo di fibrina mostra un tipico andamento sigmoidale nel quale, dopo una fase di latenza, riferibile al tempo di attivazione trombinico da parte del complesso protrombinasico, si osserva un incremento in assorbanza dovuto all'aggregazione delle molecole di fibrina, fino al raggiungimento di un valore massimo correlato con la struttura del coagulo. I risultati ottenuti confermano il ruolo inibitorio dei cloruri sulla aggregazione laterale delle molecole di fibrina che comporta la formazione di un clot a "fibre sottili" ad elevate concentrazioni dell'anione e a "fibre spesse" in assenza dello stesso. Sorprendentemente i macroscopici effetti cationici evidenziati sull'attività delle serin-proteasi isolate e determinabili dalla fase di latenza della curva di clot, sono drasticamente ridotti. Pertanto, il ruolo pro-trombotico del sodio nel processo coagulativo sembra essere di minor rilevanza se analizzato in un sistema sperimentale "ex vivo", probabilmente compensato dalla presenza di eventi molecolari ancora da determinare. Tali risultati suggeriscono la necessità di ulteriori approfondimenti diretti all'individuazione delle possibili dinamiche di interazione ioni-proteine alla base degli eventi trombotico-emorragici e dei potenziali sviluppi terapeutici di molecole capaci di modulare tali processi.

Di Stasio E., Nagaswami C., Weisel J.W. and Di Cera E. "Cl<sup>-</sup> regulates the structure of the fibrin clot" *Biophys J.* (1998) 75(4): 1973-9

**055****ASSESSMENT OF PROTEIN S ON HEPATOPATHS AT THE LAST STAGE**

Consiglio P., De Michele S., Salvia M., Calabrò G., Aiosa A., Di Maio C., Vitale G., Amato G., Esposito E., Greco V., Maratta A., Ingrassia A., Menozzi I., A.R.N.A.S Ospedale Civico.

Laboratorio Analisi, Via C. Lazzaro 1, 90100 Palermo.

Aim: in a thrombophilic study on 84 hepatopaths of degree C by Child-Pugh's classification, the free PS Ag latex test showed high values in 49 of them. In the hepatopaths the average levels of PS Ag, total and free, are either reduced or inside the lowest range and in the degree C patients there is also drastic decreasing of the PC levels. PS and PC measurements are useful in defining the thromboembolic complications that hepatopaths often encounter. The automated immuno-turbidimetric latex assay decreases the execution time compared to ELISA assay.

Methods: 49 out of 84 degree C hepatopaths in which the PS values were higher than expected and a group of sane donors (control) have been examined. We compared automated (BCT-DADE-BEHRING) latex immunologic assay (Coamatic Protein S Free-IL) to gold standard ELISA (Asserachrom Free PS-STAGO) in both groups. Results were expressed by box-whisker graph for every test and the following parameters were measured for each of the two assays, in the two groups: correlation coefficient, Passing and Bablock regression curve, Bland and Altman bias %. Results: in the group of 49 hepatopaths:  $r=0,7549$  ( $p<0,0001$ );  $y=19,2378+1,1991x$ ; a variable and high bias (VM=-53.5%, latex assay overestimates). In the control group there is a better correlation between the two assays with a more homogeneous and lower bias (VM=-8.9%). Conclusions: prudence is required in assessing the PS free levels in the degree C hepatopaths because the immuno-turbidimetric free PS Ag measurement gives higher results than the ELISA assay. An opposite result is reported in literature about functional PS test. A comparison of the assays on a big group of hepatopaths at the last stage could confirm or exclude the bias, e.g. because of the presence of interfering factors (e.g. autoantibodies).

Giri,A,JCI,1998; D'Angelo,A,ThH,1988.

**056****MONITORAGGIO A SCOPO PREVENTIVO DEL TEST DI RESISTENZA ALLA PROTEINA C ATTIVATA, IN DONNE IN ETÀ FERTILE.**

Tani M.,Milanesi B.\*

Responsabile U.O. Semplice Laboratorio Analisi  
P.O. Gavardo-Salò

\* Direttore Servizio di Patologia Clinica

A.O. Desenzano del Garda

Località Montecroce Desenzano (BS)

Abbiamo sottoposto a monitoraggio, nel corso di un anno di osservazione, 121 pazienti di sesso femminile in età compresa fra i 16 ed i 38 anni, da sottoporre a terapia anticoncezionale di tipo ormonale, tramite l'utilizzo del test di Resistenza alla Proteina C attivata, viste le numerose segnalazioni e la potenziale associazione fra terapia estroprogestinica ed insorgenza di trombosi venosa.

La metodica da noi utilizzata nella ricerca, secondo una vasta letteratura prodotta in questi anni, è di estremo interesse nella valutazione e nell'inquadramento del rischio trombofilico.

I dati ottenuti ci consentono di affermare -in modo preliminare- che il test ha mostrato un elevato valore predittivo negativo (VPN) e che il suo utilizzo deve in ogni modo essere integrato da informazioni provenienti dallo studio della biologia molecolare del fattore coagulativo potenzialmente affetto.

In particolare sono indispensabili le informazioni che definiscono il paziente portatore in forma omozigote od eterozigote per il FV Leiden, vista la ricca, ma contrastante letteratura prodotta in questi anni.

Il test da noi utilizzato è stato il ProCGlobal®/FV implementato su coagulometro BCS, in grado di valutare l'intero sistema correlato alla proteina C; reattivi e strumento sono entrambe distribuiti da Dade-Behring (Marburg-Germany).

I risultati ottenuti sono stati espressi tramite PCAT-RN, normalizzando il test verso uno standard di cui è noto il valore di sensibilità, utilizzando i limiti di riferimento suggeriti per la metodica (cut-off > 0.80). I risultati ottenuti dall'analisi dei 121 campioni sono così riassumibili: valore medio nella popolazione oggetto dello studio 1.01, media geometrica dei valori 0.98, DS 0.20, valore minimo 0.42, valore massimo 1.39.

Gli 11 campioni ritenuti positivi (9%), con valori di PCAT/RN compresi fra 0.42 e 0.74 sono stati inviati ad un laboratorio esterno e sottoposti ad indagine molecolare tramite metodica P.C.R. per ricerca FV Leiden, consentendoci di classificare le pazienti: n.1 soggetto omozigote, n.9 soggetti eterozigoti, n.1 soggetto positivo al test ma negativo all'indagine molecolare.

Abbiamo quindi estrapolato vari parametri statistici per definire il test ProCGlobal® ottenendo queste valutazioni: sensibilità 93%, specificità 99%, accuratezza 98%, valore predittivo positivo (VPP) 94%, valore predittivo negativo (VPN) 99%.

Dai dati in nostro possesso si evince che con l'utilizzo del cut-off proposto dal Produttore si ottiene una elevata specificità nella risposta, mentre il significativo dato per VPN ci autorizza, ad escludere la presenza del rischio per tromboembolismo nel soggetto clinicamente silente.

**Bibliografia**

J.Endrikat, M.Noah, C.Gerlinger, R.Bannemerschult, W.Junge, A.Ruebig, W.Schmidt, B.Düsterberg  
Impact of oral contraceptive use on APC-resistance : a prospective, randomized clinical trial with three low-dose preparations. *Contraception* 64 (2001)217-222

**057****IPEROMOCISTEINEMIA E TROMBOSI: IL VALORE DIAGNOSTICO DEL TEST DA CARICO DI METIONINA**

Durante C., Boschian-Boschin R.\*, Steffan A.\*

Ospedale De Gironcoli Conegliano (TV)

\*I.R.C.C.S. Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori, Aviano (PN)

L'iperomocisteinemia (HHcy) è un noto fattore di rischio tromboembolico (TE) e ha un'origine multifattoriale (genetica, nutrizionale, farmacologica). Tra i fattori genetici rivestono un ruolo importante le mutazioni dell'enzima metilen-tetraidrofolato reductasi (MTHFR), tra quelli nutrizionali i deficit di vitamina B<sub>6</sub> o B<sub>12</sub> o di folati. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'associazione tra HHcy e patologia trombotica e/o familiarità trombotica in pazienti privi di altre alterazioni di parametri trombofilici. Sono stati valutati il livello basale di Hcy e le eventuali mutazioni C677T e A1298C dell'enzima MTHFR in 57 pazienti e in 42 donatori sani. Abbiamo eseguito il test da carico di metionina per rilevare le alterazioni latenti di Hcy (test positivo con differenziale >20µmol/L). I campioni sono stati centrifugati entro un'ora dal prelievo o posti in ghiaccio per un massimo di 6 ore. La determinazione dell'Hcy sierica è stata effettuata su analizzatore IMX (Abbott, USA). Per il test da carico, è stata somministrata la metionina (0.10gr/Kg di peso corporeo, diluita in 200ml di succo di frutta) e la Hcy è stata dosata dopo 4 ore. Per i tests genetici si è eseguito il saggio PCR e il prodotto della reazione è stato rivelato mediante ibridazione dei prodotti amplificati su striscia contenente sonde oligonucleotidiche allele-specifiche. I pazienti omozigoti per C677T avevano un livello medio (24.48±18.21 DS) di Hcy statisticamente superiore (p<0.05) rispetto ai controlli (7.06). Il test da carico si è dimostrato predittivo di omozigosi per la mutazione C677T. Sia i pazienti che i controlli con mutazione C677T in eterozigosi sono risultati negativi al test da carico. Questi dati preliminari confermano l'importanza dell'HHcy nella patologia TE e sembrano indicare che, nella valutazione del rischio trombofilico, il test genetico non fornisca notizie in più rispetto al test da carico. Quest'ultimo, soprattutto nello screening dei pazienti con Hcy ai limiti di norma, sembra preferibile in quanto esplora l'alterazione funzionale a prescindere dal difetto.

Armando D'Angelo et. Al. Gene-Gene and Gene Environment Interactions in Mild Hyperhomocysteinemia. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;72004; 33: 337-341.

**058****PERDITA DI LINEARITÀ ED ACCURATEZZA DEL METODO CLAUSS MULTIFIBREN U PER CONCENTRAZIONI DI FIBRINOGENO ENTRO IL RANGE DI RIFERIMENTO**

Introcaso G., Bonato C.  
Centro Cardiologico "Monzino" Milano

**Background:** L'aumento delle concentrazioni plasmatiche di fibrinogeno è dovuto a differenti fattori fisiologici e patologici tra cui fattori genetici, reazioni della fase acuta, sesso ed età. I sistemi analitici raccomandati secondo il metodo Clauss e Clauss modificato utilizzano l'analisi della cinetica coagulativa dove la velocità di formazione del coagulo è influenzata dalla concentrazione stessa del fibrinogeno anche all'interno del range di riferimento. Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'accuratezza del sistema Multifibren U/BCS (Dade Behring) per concentrazioni di fibrinogeno prossime al limite superiore di normalità pari a 450 mg/dL.

**Metodi:** Sono stati analizzati campioni di plasma citratato (N° 94) con valori di fibrinogenemia compresi tra 149 e 842 mg/dL randomizzati nella routine di laboratorio in differenti serie di lavoro. I tempi di coagulazione sono stati misurati con coagulometro BCS (Dade Behring) utilizzando la metodica Multifibren U (metodo1) e la metodica con thrombin reagent (Clauss) (metodo2). I campioni prelevati con sistema vacutainer sono stati centrifugati a 1800 g per 10-15 minuti ed analizzati entro 1 ora dal prelievo. Abbiamo considerato il metodo 2 come metodica Clauss di confronto utilizzabile sul medesimo coagulometro BCS. È stata effettuata una valutazione delle caratteristiche analitiche delle curve di calibrazione delle 2 metodiche ed analisi statistica dei risultati secondo test T di Student per campione unico.

**Risultati:** Per concentrazioni di fibrinogeno superiori a 600 mg/dL e inferiori a 400 mg/dL le 2 metodiche hanno dato risultati paragonabili seppure per concentrazioni elevate il metodo 2 ha mostrato maggiore variabilità a causa della diluizione ulteriore del campione 1:20. Nell'intervallo tra 400 e 600 mg/dL il metodo 1 ha evidenziato uno scostamento sistematico delle concentrazioni di fibrinogeno evidenziando valori sovrastimati rispetto al metodo 2 (bias assoluto medio = 64 mg/dL). Essendo misure prossime al limite di normalità del laboratorio pari a 450 mg/dL i risultati con il metodo 1 sarebbero stati interpretati come patologici o alterati. Dati clinici di pazienti presunti sani e risultati relativi a esercizi VEQ hanno confermato la sovrastima dei dosaggi della fibrinogenemia con metodica Multifibren U. Le differenze tra le medie delle concentrazioni di fibrinogeno 502 mg/dL (metodo 1) versus 437 mg/dL (metodo 2) si sono rivelate statisticamente significative ( $p < 0,0001$ ). L'analisi delle curve di calibrazione ha mostrato una minore interpolazione lineare del metodo 1 rispetto al metodo 2 rispettivamente  $R^2 = 0,32$  versus  $R^2 = 0,79$ .

**Conclusioni:** La metodica Multifibren U per valori di fibrinogeno compresi tra 400 e 600 mg/dL tende a sovrastimare i risultati relativi a soggetti presunti sani. Sarebbe auspicabile a causa delle caratteristiche analitiche sfavorevoli (range di misura troppo elevato da 80 a 1500 mg/dL e bassa linearità) ottimizzare tale metodica per poter utilizzare la fibrinogenemia anche come fattore di rischio protrombotico o cardiovascolare.

**059****VALUTAZIONE DI UN ASPETTO DELLA FASE PREANALITICA NELLA DETERMINAZIONE DEL TEMPO DI PROTROMBINA**

Daves M., Cosio G., Floreani M., Scala S., Rizza F.  
Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

**Scopi:** abbiamo valutato i risultati espressi in International Normalized Ratio ottenuti da campioni di donatori utilizzando differenti provette per coagulazione fornite da tre diverse ditte.

**Metodi:** abbiamo raccolto per 3 giorni consecutivi da 23 volontari (n=69 diversi donatori) 2 campioni di sangue per ciascun soggetto dispensati in differenti provette per coagulazione; 1° giorno: Terumo/Becton Dickinson (BD), 2° giorno Terumo/Greiner, 3° giorno Terumo/Kima. I prelievi sono stati eseguiti da un operatore esperto con ago da 21-gauge. Tutte le determinazioni sono state processate con l'analizzatore BCT (Dade-Behring).

**Risultati:** 1) provette in uso vs BD, Terumo: valore minimo 0.97, valore massimo 1.68, media 1.06, DS 0.14; BD: valore minimo 0.78, valore massimo 1.68, media 1.03, DS 0.15. Il coefficiente di correlazione  $r = 0.94$ , il Bland-Altman plot mostra una differenza percentuale della media del 2.4%, la regressione di Passing-Bablok risulta  $Y = -0.0761 + 1.0561X$ , slope 1.056 (95% CI da 0.667 a 2.000), intercetta -0.076 (95% CI da -1.071 a 0.330).

2) provette in uso vs Kima: Terumo: valore minimo 0.99, valore massimo 2.24, media 1.11, DS 0.26; Kima: valore minimo 0.90, valore massimo 2.16, media 1.07, DS 0.25. Il coefficiente di correlazione  $r = 0.991$ , il Bland-Altman plot mostra una differenza percentuale della media del 3.1%, la regressione di Passing-Bablok  $Y = -0.03 + 1.00X$ , slope 1.00 (95% CI da 0.889 a 1.059), intercetta -0.030 (95% CI da -0.097 a 0.091).

3) provette in uso vs Greiner: Terumo: valore minimo 0.94, valore massimo 1.17, media 1.04, DS 0.05; Greiner: valore minimo 0.92, valore massimo 1.13, media 1.02, DS 0.05. Il coefficiente di correlazione  $r = 0.787$ , il Bland-Altman plot mostra una differenza percentuale della media del 2.5%, la regressione di Passing-Bablok  $Y = -0.03 + 1.00X$ , slope 1.00 (95% CI da 0.765 a 1.545), intercetta -0.030 (95% CI da -0.601 a 0.219).

**Conclusioni:** l'analisi statistica dei dati ottenuti indica che l'utilizzo di differenti provette con reagenti e tromboplastina dello stesso lotto non porta a differenze significative nella valutazione del PT.

**Bibliografia:** 1) Horsti J., Uppa H., Vilpo AJ: Poor Agreement among Prothrombin Time International Normalized Ratio Methods: Comparison of Seven Commercial Reagent. Clin Chem 2005; 51: 553-60.

**060****GENOMIC MEDICINE AND THROMBOTIC RISK: WHO, WHEN, HOW AND WHY?**

Federici C., Gianetti J., Manfredi S., Botto N., Parri M.S., Clerico A., Andreassi M.G.  
CNR, Institute of Clinical Physiology, "G. Pasquinucci" Hospital, Massa, Italy

**Background.** Major advances in Human Genome research could change significantly the clinical practice of medicine, providing new possibilities for diagnosis and treatment. Many genetic tests are now commercially available for predicting future risk to common disorders. However, genetic testing has potential benefits and limitations for patients, and it should not be used to 'screen' general population. Diagnostic assays for a predisposition of both venous and arterial thrombosis are among the most requested genetic tests in molecular diagnostics laboratories. However, there is considerable uncertainty as to how this information should be utilized in patient management.

**Aim.** To discuss our experience about the usefulness and practical applications of thrombotic genetic testing to define which patients should be tested for both venous and arterial thrombotic risk in order to have an acceptable cost/benefit ratio and to prevent the patient's anxiety.

**Methods.** We used an assay for the simultaneous identification of factor V Leiden, prothrombin (G20210A) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) gene mutations based on polymerase chain reaction and reverse-hybridization.

**Results and conclusions.** Genetic testing might offer important opportunities for patient management, such as prophylactic anticoagulation therapy or avoidance of other risk factors. Genetic testing could be performed only in high-risk subgroups of patients, such as in myocardial infarction in female smokers under age 40. Moreover, testing may be worthwhile for young patients (<50 years of age) who develop acute arterial thrombosis in the absence of other traditional risk factors, women receiving hormonal replacement therapy and patients with early saphenous vein graft failure.

**061****A REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE ANALYSIS OF THE PROTHROMBIN G20210A, THE FACTOR V LEIDEN, Y1702V AND H1299R MUTATIONS**

Albarosa R., Rossi E., Mantero G., Briscini L  
Biodiversity SpA, via Corfù 71, 25124 Brescia

We report the development of a multiplex four-color real-time protocol for the simultaneous detection of three mutations in factor V (Leiden, Y1702C and H1299R) and the prothrombin G20210A mutation using two closed tubes and a single thermocycling protocol.

The procedure combines the sensitivity of the polymerase chain reaction and the specificity provided by the hybridization of allele-specific oligonucleotide using the 5' nuclease assay format.

Four fragments, including the four mutations, were amplified in two tubes using four specific primer pairs, and detected by four allele-specific oligonucleotide probes, labeled with different fluorophores, FAM, HEX, TEXAS RED and CY5.

To evaluate the specificity of the protocol, we performed a comparison study with 30 DNA samples obtained from individuals of known factor V/prothrombin genotype. Results from the study showed that the four-colour real-time assay reproduced the combinations previously acquired. We conclude that this technique can be useful for the rapid detection of factor V and prothrombin mutations and can be easily adapted for the detection of other single nucleotide polymorphisms.

**062****INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SUL RISCHIO TROMBOEMBOLICO IN UNA POPOLAZIONE DEL BASSO MOLISE.**

Bucci M., Scutellà M., Salerno D. M. M., Villani A., Piacenti G., Colavecchia G., Tagliaferri A.\*, Sessa M.\*, De Lucia D.\*

Laboratorio di Analisi P.O. "G. Vietri" Via Lualdi 86035 Larino (CB)

(\*) Laboratorio di Emostasi e Trombosi II Università degli Studi di Napoli

Nella regione Molise attualmente ancora non si conosce l'impatto epidemiologico delle malattie tromboemboliche. A tale scopo durante la fiera di Larino tenutasi dal 6 al 10 ottobre del 2004 abbiamo offerto alla popolazione afferente l'opportunità di eseguire esami di laboratorio di I, II e III livello compresi gli esami per polimorfismi genetici. Pertanto abbiamo eseguito secondo le metodiche internazionali i seguenti esami per lo screening delle trombofilie: PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina III, Proteina C, Proteina S, Resistenza alla Proteina C attivata, Fattore VIII coagulante, Fattore X coagulante, Fattore II (G20210A) e Fattore V Leiden (G1691A).

Sono venuti al nostro stand 217 persone relativamente ad una popolazione campione di circa 90,000 abitanti di tutta la provincia. I nostri risultati hanno evidenziato 30 soggetti con mutazioni per il fattore II e per il fattore V Leiden. In particolare per quanto concerne il Fattore II abbiamo riscontrato 19 soggetti eterozigoti (8.7%) ed 1 omozigote recessivo (0.4%). Relativamente al Fattore V Leiden 10 soggetti sono risultati eterozigoti (4.6%) e nessun soggetto è risultato omozigote per la stessa mutazione. Il Fattore V Leiden correla perfettamente con la Resistenza alla Proteina C attivata (valori normali per ratio secondo Bertina pari a  $>0.75$ ;  $\rho=8.67$ ,  $p<.001$ ), mentre non ci sembra significativa la correlazione con gli altri parametri biochimici dell'emostasi quali l'APTT, il fibrinogeno ed i fattori VIII e X della cascata coagulativa. Ai soggetti risultati positivi per le mutazioni trombofiliche abbiamo offerto un consulenza emocoagulativa ed eugenetica. A tal proposito abbiamo costruito alberi genealogici per cinque nuclei familiari (3 con difetto del fattore V Leiden e 2 con difetto della protrombina). La nostra indagine genetica ha messo alla luce una storia di malattia tromboembolica sia arteriosa che venosa nei nuclei familiari sottoposti a screening. I nostri risultati hanno confermato che anche nella nostra regione, dove vi è un alto tasso di longevità, si riscontra una certa penetranza di geni trombofilici e si possono identificare nuclei familiari a più alto rischio tromboembolico.

Riteniamo pertanto, di grande impatto per la prevenzione delle malattie tromboemboliche lo screening trombofilico nei soggetti afferenti alla nostra Azienda Ospedaliera e con storia familiare di malattia tromboembolica.

- Lane D.A., Mannucci P.M., Bauer K.A., Brina T.M. et al.: *Inherited Thrombophilia: part I. Haemostasis and Trombosis* 1996; 76 (5):651-662.

**063****VALUTAZIONE DEL SISTEMA PER EMOSTASI ACL TOP IN UN LABORATORIO DI GRANDI DIMENSIONI**

Mercurio, S., Fanelli, A., Rossetti, M., Caporale, R., Laboratorio Generale Dip. Diagnostica di laboratorio, AOU-Careggi, Firenze

Lo scopo dello studio è stato di valutare il sistema per emostasi ACL TOP in accordo con il protocollo ECCLS (European Committee for Clinical Laboratory Standards) e di verificarne l'integrazione all'interno del nostro laboratorio. La valutazione ha preso in considerazione i seguenti test: PT, Fibrinogeno metodo-PT, Fibrinogeno metodo-Clauss, APTT, Antitrombina e D-Dimero. E' stata verificata l'imprecisione dei metodi sia nella-serie che totale, il carry-over reagenti, la correlazione dei risultati della routine rispetto al sistema BCS (Dade-Behring) per PT, Fibrinogeno (metodo-PT e metodo-Clauss), APTT e Antitrombina; inoltre rispetto al Vidas (Biomérieux) per il D-Dimero. E' stato anche determinato il range di normalità per i parametri della routine. Lo studio ha dimostrato buoni risultati di precisione nella-serie per i livelli dei controlli normali, basso e alto (CV massimo per il PT di 1,4%, 2,6% e 3,2% rispettivamente; per l'APTT di 1,3%, 2,9% e 2,3%; per il Fibrinogeno metodo-PT di 2% e 4%; per il Fibrinogeno metodo-Clauss di 5% e 8%; per l'Antitrombina di 3% e 4%; per il D-Dimero di 4% e 9%) e totale (CV massimo per il PT di 7.2% e 7.8%, per l'APTT di 5.4% e 7.1%, per il Fibrinogeno metodo-PT di 8.0% e 24.0%, per il Fibrinogeno metodo-Clauss di 11.0% e 11.1%, per l'Antitrombina di 6.0% e 40% e per il D-Dimero di 6.0% e 8%). La correlazione è stata eseguita su 403 campioni per PT, 534 per APTT, 357 per Fibrinogeno metodo-PT, 110 per Fibrinogeno metodo-Clauss, 141 per Antitrombina tutti rispetto al BCS e 266 per il D-Dimero rispetto al Vidas. Questi campioni erano rappresentativi della casistica del nostro laboratorio e distribuiti sia all'interno del range di normalità sia nella zona patologica. Non è stato osservato carry-over significativo fra reagenti. L'analisi statistica di Bland-Altman (bias-plot) e la regressione hanno dimostrato una buona correlazione per il PT ( $r=0,9872$ ), per il Fibrinogeno metodo-PT ( $r=0,9191$ ), per il Fibrinogeno metodo-Clauss ( $r=0,9339$ ), per l'APTT ( $r=0,8340$ ), per l'Antitrombina ( $r=0,9399$ ) ed il D-Dimero ( $r=0,8881$ ). Il range di normalità trovato utilizzando 96 campioni afferenti dal centro trasfusionale è il seguente: PT da 9,9 a 12,7 secondi; APTT da 23,8 a 34,7 secondi; Fibrinogeno metodo-PT da 398 a 408 mg/dL; Fibrinogeno metodo-Clauss da 225 a 430 mg/dL e Antitrombina da 87 a 127%. Per il D-Dimero è stato definito un limite superiore al range normale di 250 ng/mL. Il sistema ACL Top ha evidenziato buone prestazioni analitiche e ha dimostrato facilità d'uso e velocità d'esecuzione dei test che lo rendono adeguato per l'utilizzo anche in laboratori di grandi dimensioni.

**064****MONITORAGGIO DELLE ATTIVITA' IN UN LABORATORIO CLINICO MEDIANTE TECNICHE SPC**

Celano G.<sup>\*</sup>, Fichera S.<sup>\*</sup>, Milluzzo C.<sup>\*</sup>, Cimino M. °, Chinnici L.°, Damante A.°, Di Stefano M., Mirulla P.°, Padalino M.°, Sciacca M. °, Marchese A.E.°

<sup>\*</sup>Dipartimento di Ingegneria Industriale e Meccanica, Università di Catania.

°Laboratorio Analisi P.O.S. Bambino, Azienda V. Emanuele, Ferrarotto e S. Bambino, Catania

*Introduction to the problem:* Statistical Process Control (SPC) tools are traditionally implemented within a manufacturing process to monitor the state of control of a parameter influencing the quality of the final product. However, as suggested by the Joint Committee for Accreditation of Healthcare Organizations, the SPC tools can be effectively implemented within a healthcare organization to help decision makers in the development of quality assessment and measurement activities.

*Objectives and methods:* The aim of this contribution is to present the results concerning the implementation of some SPC tools, i.e. the control charts, to monitor the quality level of two different areas of control within a Biochemistry Clinical Laboratory: the process related to the non conformities collection / measurement and the on-line control of the operating parameters affecting the correct functionality of several analysis machines. Control charts are a family of statistical tools providing a continuous on-line control of a specific parameter: their statistical properties are based on statistical inference and hypothesis testing; the chart consists of a graph having control interval, defined with reference the statistical distribution of the monitored statistic. Common control charts can work both on qualitative and quantitative variables, on individual or grouped measurements. Due to the limited number of data, depending on the costs related to sampling activities, control charts for individual measurements were implemented on parameters affecting machines performances. The proposed charts replaced the default monitoring run charts directly implemented within the machine control system.

*Results:* The implementation of the SPC control charts allowed the state of statistical control for several activities performed within the Biochemistry Clinical Laboratory to be monitored. Signals from the charts or other anomalies in the random behavior of plotted points, not signaled by the run charts, were used by the decision makers to detect the presence of some special causes affecting the quality of the activities monitored by the charts. Finally, for the monitored processes, statistical control limits based on parameters random distributions were defined.

*Conclusions:* Whichever the qualitative or quantitative nature of the controlled variable, SPC control charts are an effective tool for process control monitoring in the field of healthcare application, which helps the decision maker in a rapid detection of possible out of control conditions.

**065****LA VALUTAZIONE DEI CARICHI DI LAVORO IN UN LABORATORIO CLINICO: UN APPROCCIO INGEGNERISTICO PER PROCESSI**

Celano G.<sup>\*</sup>, Fichera S.<sup>\*</sup>, Musumeci V.<sup>\*</sup>, Bonaccorsi V.°, Calanna G.°, Chinnici L.°, Damante A., Genuardi S., La Rosa A.°, Paladino A.°, Sciacca M.°, Zagami N.°, Marchese A.E.°

<sup>\*</sup>Dipartimento di Ingegneria Industriale e Meccanica, Università di Catania.

°Laboratorio Analisi P.O.S. Bambino, Azienda V. Emanuele, Ferrarotto e S. Bambino, Catania

*Introduction to the problem:* In the last decade the implementation of a Total Quality Management (TQM) approach within healthcare organizations has captured the attention of hospital administrations to achieve a high standard level of their provided services and consequently an accreditation to excellence. This goal requires to hospital decision makers an effort to re-engineer through proper managerial tools the activities of their departments, in order to eliminate all the possible causes badly influencing the quality of their outcomes.

*Objectives and methods:* In a TQM environment decision makers are required to have a complete knowledge about all the activities performed within the organization and the involved resources: these aspects should be clearly defined before going on with the development of quality indicators, the performing of service evaluation procedures and the individuation of how patients perceive the provided service. Thus, an interdisciplinary "systems engineering approach" based on defining activities within a healthcare organization as "processes" based on inputs, outputs, controls, methods and disturbances can significantly help the healthcare manager in the detection and elimination of possible areas lacking of efficiency within the organization. The objective of this contribution is to demonstrate how a managerial practice typical of the manufacturing environment, where activities are modeled by interrelated complex processes within a system, can be easily extended to an healthcare organization like a Biochemistry Clinical Laboratory. *Results:* The engineering tools were implemented within one working area of the Laboratory: three different flow lines were identified through the routing of parts within the processing machines and the tasks of human resources: the employed staff within the area consists of one responsible unit heading activities; three specialized units, working on each one of the modeled flow lines; a cross-trained unit, who works throughout the entire area. Their activities were monitored, measured and clustered to evaluate the time standards and workload partition on each resource.

*Conclusions:* In this research, the positive contribution of a managerial approach based on systems-engineering to the management of activities of a Biochemistry Clinical Laboratory was investigated: the implementation of this approach allowed the complex interrelations among the involved resources to be individuated, measured and, if necessary, re-engineered.

**066****VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ' (VEQ) E PRESTAZIONI ANALITICHE: IL CASO DEI MARCATORI CARDIACI**Sciacovelli L.<sup>1</sup>, Zaninotto M.<sup>2</sup>, Plebani M.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica, Via Ospedale 18, 31033 Castelfranco Veneto (TV); <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale, Via Giustiniani 2, 35128 Padova.

La VEQ ha lo scopo di migliorare le prestazioni analitiche dei laboratori mediante Schemi strutturati secondo ben definite specifiche di qualità e conformi alle esigenze cliniche.

I risultati riportati in questo studio riassumono un'esperienza effettuata nell'ambito del Programma di VEQ per i Marcatori Biochimici di Lesione Miocardica condotta allo scopo di identificare le cause di un inaspettato numero di prestazioni non accettabili riscontrate nei primi tre esercizi del ciclo 2004, relativamente alla Troponina I (cTnI) e Troponina T (cTnT). Mediante un questionario inviato ai partecipanti e la collaborazione con i produttori dei sistemi diagnostici sono state valutate le modalità operative adottate dai laboratori relativamente alla fase pre-analitica (trattamento del materiale di controllo VEQ) e analitica (modalità di calibrazione, gestione del controllo di qualità interno e relative validazioni). I risultati dell'indagine hanno evidenziato un inadeguato trattamento dei materiali di controllo, un'inaccurata applicazione delle procedure di validazione della calibrazione ed una carente gestione del CQI. Di conseguenza, in collaborazione con i produttori dei sistemi diagnostici, è stata formalizzata e distribuita a tutti i partecipanti una istruzione riassuntiva delle corrette modalità operative da adottare. Contemporaneamente, è stata effettuata una valutazione di differenti materiali di controllo commercialmente disponibili al fine di individuare quelli più idonei sul mercato ed adottarli nel nuovo ciclo. Nel 4°, 5° e 6° esercizio, si è osservato che il numero totale di PNA per la TnI (calcolato solo per i sistemi diagnostici con un maggiore numerosità) si è ridotto dal 44.3% al 32.9% per basse concentrazioni e dal 34.8% al 14.3% per alte concentrazioni. Per quanto riguarda la cTnT la riduzione del numero di PNA si è riscontrata dal 1° esercizio del 2005 (da circa il 60% al 20%) con l'introduzione di nuovi materiali di controllo che hanno permesso di risolvere alcune problematiche pre-analitiche. I risultati ottenuti sottolineano come la collaborazione tra laboratori, produttori e organizzatori di programmi di VEQ sia essenziale per supportare il personale del laboratorio ad identificare i problemi e promuovere il miglioramento continuo delle proprie prestazioni.

**067****INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER I COMPONENTI DI CHIMICA CLINICA: UNA PROPOSTA.**

Incorvaia L.R.

Gruppo VEQ - A.O.U. di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi-

L'argomento è sempre dei più attuali; infatti, sono sempre più frequenti le sollecitazioni di Organismi Scientifici affinché il Programma di VEQ assuma tra le proprie competenze altri elementi del processo analitico tra i quali gli intervalli di riferimento (IR) e più in generale qualsiasi espressione utilizzata quale discrimine tra normalità e patologia. Il nostro Programma di VEQ è stato antesignano in questo contesto in quanto dal momento della sua attivazione (1987) ha considerato il dato sperimentale nella sua accezione più ampia di "indicatore diagnostico" assumendo anche gli IR quale parte integrante da valutare contestualmente. La stretta connessione con l'inesattezza (relativa o assoluta) del dato sperimentale è evidente; le differenze sistematiche tra metodi sono ancora presenti, in particolare per gli enzimi, a volte anche in termini accentuati, per certi versi difficilmente modificabili allo stato attuale della tecnologia. L'unica possibilità di intervento a livello di uniformità dell'informazione clinica rimane quella di una migliore congruenza degli IR. La validità del lavoro svolto viene supportata anche dalla preparazione del materiale di controllo che è prodotto autonomamente con matrici naturali non arricchite, a garanzia della commutabilità e dall'invio dei campioni in forma congelata per mantenere le caratteristiche definite, requisiti indispensabili per rendere affidabile questo approccio. In oltre 15 anni di attività di VEQ in chimica clinica numerosi sono state le segnalazioni di IR non congruenti, pur essendo questo un settore in cui è sempre stata presente una situazione decisamente più accettabile rispetto a quella rilevata in altri comparti. In questo studio sono stati considerati gli IR comunicati dai laboratori partecipanti nel ciclo di controllo 2004. L'analisi statistica ha preso in considerazione il calcolo degli indici di posizionamento quali il valore medio, mediano, modale (con percentuale di frequenza) sia di tutti gli IR che di quelli compresi nell'intervallo 10°-90° percentile. Per alcuni componenti inoltre, sono stati valutati gli stessi indici in funzione del principio metodologico o delle caratteristiche intrinseche dell'analita stesso (tampone per ALP, attivatore per CK ecc.).

**Risultati** - L'analisi effettuata su tutti i 28 componenti che fanno parte del profilo, ha lo scopo di fornire al laboratorio un efficace supporto nella scelta degli IR da adottare fornendo quale parametro di riferimento l'IR mediano definito al 10°-90° percentile. Gli IR consigliati dalle Aziende produttrici, che sono adottati dal 60% circa dei laboratori, in alcuni casi forniscono una indicazione non congruente con le prestazioni del metodo stesso. Classico è l'esempio della chimica secca che per acido urico, sodio, potassio e magnesio è perfettamente allineata in termini di valori assoluti agli altri metodi/sistemi, ma non per quanto riguarda gli IR, che non sono sovrapponibili. In questo caso l'informazione clinica che ne deriva può dare indicazioni fuorvianti.

**068****TIPOLOGIA E FREQUENZA DEGLI ERRORI PRE-ANALITICI: STRATIFICAZIONE DEI DATI DI UN ANNO DI GESTIONE CERTIFICATA**

Longhi E., Mauro L., Dolci A., M.Barberis.  
Dipartimento di Patologia MultiMedica, via Fantoli 16/15, 20138 Milano

Scopo del lavoro: valutare in modo continuo e sistematico la tipologia e la frequenza degli errori della fase preanalitica del primo anno di applicazione del modello UNI EN ISO 9001:2000, come contributo alla gestione degli errori in medicina di laboratorio.

Metodologia: è stata eseguita la raccolta, per un anno, di tutte le non conformità (NC) della fase preanalitica registrate presso il laboratorio. I dati raccolti sono poi stati stratificati, mediante apposita codifica degli eventi ed analizzati secondo l'analisi di Pareto. Per garantire la massima rappresentatività di analisi tutti i risultati ottenuti sono stati pesati in funzione del numero di esami prodotti e del numero di utenti afferenti. Risultati: Lo studio ha rilevato 2048 NC su un totale di 1.479.974 esami erogati (0,14%), e di 160.500 utenti (1.33%), distribuite in NC a carico dei reparti interni (63%) ed ai centri prelievo esterni (37%). Preso come significativo l'80% delle NC totali, sono stati pesati i dati in funzione della provenienza e della tipologia. Inoltre è stata studiata la distribuzione percentuale del numero di NC in funzione del numero degli esami delle sedi che presentavano una incidenza maggiore di 0.14% (da 1.88% a 0.22%) e del numero di utenti delle sedi con un'incidenza maggiore di 1.33% (da 5.87% a 1.43%). Le tipologie di NC più significative secondo l'analisi di Pareto, che corrispondenti all'80% del totale sono state nell'ordine: NC2 "Paziente non correttamente identificato" (30%); NC3 "Volume di campione insufficiente" (19%); NCT100 "Temperatura rilevata non idonea alla conservazione dei campioni durante il trasporto" (16%); NC13 "rapporto sangue additivo inadeguato" (6%); NC11 "Non corretta compilazione delle bolle di accompagnamento" (5%); NC5 "Campioni non conservati a temperatura esigente" (3%).

Conclusioni: lo studio di stratificazione della tipologia e della frequenza degli errori della fase preanalitica rilevati, attraverso l'applicazione del modello UNI EN ISO 9001:2000, ha consentito una identificazione chiara ed univoca delle criticità della fase preanalitica. Questo ha permesso al laboratorio di effettuare un'attenta analisi delle cause e di impostare il conseguente trattamento mediante opportune azioni correttive di miglioramento. Tali azioni si sono concretizzate in ripianificazione dei processi, sensibilizzazione del personale, informazione, coinvolgimento e condivisione con le sedi di prelievo dei risultati al fine di pervenire ad una ottimizzazione dell'intero processo di laboratorio.

Bibliografia: Bonini P.A. ed al. Errors in Laboratory Medicine, Clin Chem 2002; 48: 691-698.

**069****VALUTAZIONE DELLA STABILITA' DI ALCUNI ANALITI IN OSPEDALI MULTIPRESIDIO CON LABORATORIO CENTRALIZZATO**

Balboni F.; Moscardò S.\*; Morrocchi B.; Rombolà P.; Salati A.; Vitale V.; Lorenzini S.\*; Del Genovese A.\*

Laboratorio Analisi IFCA, Firenze

\*Laboratorio Analisi Biochimico-Cliniche e Microbiologiche ASL1.

Introduzione: sempre più frequentemente si assiste oggi alla centralizzazione dei servizi diagnostici di medicina di laboratorio. Negli ospedali multipresidio questo comporta che i campioni siano trasportati per un tempo variabile non solo dalla distanza geografica dei presidi dal laboratorio ma anche dalla logistica dei trasporti.

Il Laboratorio Centrale dell'ASL1 è diviso per alcune attività tra il P.O. di Massa e il P.O. di Carrara. Il collegamento tra laboratori è garantito da un servizio navetta che a orari stabiliti consegna la provette.

*Il gruppo GIOMI a Firenze ha due strutture: l'IFCA nell'area ospedaliera Careggi e la CDC S. Chiara nel centro della città. I prelievi vengono trasportati da S. Chiara all'IFCA dove è situato il laboratorio.*

Scopo del lavoro è stato quello di valutare la stabilità analitica dei parametri più critici in medicina di laboratorio per essere certi di assicurare sempre la migliore qualità al cliente-utente.

Materiali e metodi: 60 campioni sono stati analizzati al tempo 0 per i seguenti parametri: glucosio, potassio, PT, PTT, AT, FIB, WBC, RBC, HB, HCT, MCV PLT.

I campioni sono stati collocati negli appositi contenitori e trasportati a temperatura controllata per il tempo di normale percorrenza fra i presidi ed il laboratorio + 1 ora. Successivamente i campioni sono stati riportati al laboratorio e rianalizzati gli stessi parametri sugli stessi analizzatori al tempo T1.

Risultati:

	Diff Med % ASL 1	Diff Med % IFCA	FRASER CVa	TEa VEQ
WBC	-0.06	3.96	5.3	14.6
RBC	0.92	0.46	1.6	4.4
HB	-0.49	-0.39	1.4	4.1
HCT	1.73	1.03	1.4	4.1
MCV	0.64	0.59	0.7	2.3
PLT	-1.77	0.84	4.6	13.4
GLUC	-6.54	-14.57	3.3	7.9
K	2.86	-0.95	2.4	5.8
PT	-0.91	-2.84	2.0	5.3
APTT	3.09	0.40	1.4	4.5
FIBR	-1.67	1.55	5.4	13.6
AT III	4.51	0.53	2.6	8.3

Conclusioni: la maggior parte dei parametri ben risponde alle specifiche di qualità non risentendo del trasporto fra presidi. Il glucosio è l'unico analita che come ben noto in letteratura ha una stabilità inferiore alle due ore. La differenza ASL1-IFCA è dovuta probabilmente alla non perfetta refrigerazione durante il trasporto all'IFCA che ha già predisposto da ora in avanti il trasporto in ghiaccio.

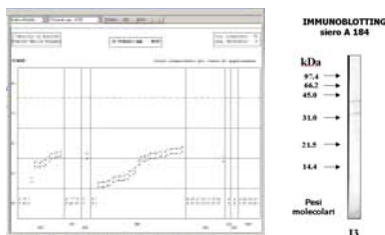
Bibliografia: Working Group on preanalytical quality of the German Society Clin Chem German Society for Lab Med Annex in Guder 2001

**070****PROGRAMMA DI VEQ PER LE IgE SPECIFICHE: SIERO DA MONODONATORE PER UNA EFFICACE DEFINIZIONE DELLO STATO DELL'ARTE.**

Franceschetti F., <sup>1</sup>Di Felice G., <sup>1</sup>Afferri C., <sup>1</sup>Barletta B., <sup>2</sup>Savi E., Capelli M.  
Gruppo Controllo Qualità, Az. Osp. S.Orsola-Malpighi (BO) e Policlinico (MO); <sup>1</sup>Dip.to di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma; <sup>2</sup>Servizio Immunoematologia e Trasfusione, Ospedale Civile, Piacenza.

Nell'ambito del Programma di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) della Regione Emilia Romagna, è attivo dal 1993 un profilo dedicato all'allergologia, svolto in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Attualmente aderiscono 162 laboratori rappresentanti l'intero territorio nazionale; fino a questo momento sono state effettuate 67 spedizioni per un totale di 192 campioni di controllo, ognuno dei quali dedicato al dosaggio delle IgE specifiche per allergeni correlati (acari, alberi, graminacee, epiteli, veleni di imenotteri, professionali). In questo settore d'indagine è dato massimo risalto ad una delle caratteristiche peculiari dei nostri programmi di VEQ: **la qualità del materiale di controllo**. Sono infatti utilizzati campioni costituiti da siero di **monodonatore**, spediti congelati e senza alcun trattamento preventivo. I pazienti sono selezionati secondo criteri definiti e per ciascuno vengono documentati sia i riscontri anamnestici che le risultanze dei test diagnostici "in vivo". Inoltre, nell'ambito di uno studio inserito nel programma di controllo (Cartella Clinica), i sieri di alcuni soggetti sono caratterizzati dall'ISS mediante "immunoblotting" dopo separazione con SDS-PAGE dei relativi estratti allergenici di riferimento o prodotti dall'Istituto stesso. I risultati emersi in questi anni hanno chiaramente dimostrato come sia inderogabile procedere in questo modo per avere informazioni affidabili riguardo alle problematiche esistenti e contribuire a comprenderne le possibili cause. Infatti le particolari modalità adottate nel Programma di Controllo hanno permesso di evidenziare in modo oggettivo il livello di affidabilità raggiunto nel dosaggio delle IgE specifiche: le differenze sistematiche tra metodi/systemi sono state confermate ed esaltate dall'utilizzo di sieri di singoli soggetti. Si è inoltre dimostrato come queste disparità di misura non siano costanti ma dipendenti dalla variabilità delle IgE del paziente (IgE specifiche per epitopi assenti o poco rappresentati nelle preparazioni allergeniche dei differenti metodi/systemi). Alla luce di questi riscontri, alcune Aziende produttrici hanno già apportato modifiche sostanziali ai loro metodi con il beneficio di una maggior concordanza nella classificazione del campione.



Febbraio 2005 – Siero A184 (vespula spp.)

**071****VALUTAZIONE DEL TUMOR CONTROL RANDOX**

Tura M., Filocamo M., Bovicelli R., Cavina C., Galeazzi M., Nicolini A., Szymczuk S., Ceroni V.  
U.O. Medicina di Laboratorio – Ospedale Infermi  
Via Settembrini, 2 – 47900 Rimini

Il Tumor Marker Control è un nuovo controllo a titolo noto su tre livelli per 16 marcatori prodotto e distribuito da RANDOX Laboratories Ltd.. Le caratteristiche di rilievo sono :

1. la matrice di origine umana;
2. il fatto di essere liquido pronto all'uso.

Si eliminano così i problemi di non commutabilità dovuti alla presenza di componenti animali, alla liofilizzazione, al congelamento e alla deidratazione. Dopo l'apertura, se mantenuto a temperatura di 2 –8 °C, viene definito stabile fino alla data di scadenza. Noi abbiamo dosato sui 3 livelli di questo controllo 12 marcatori quali: CEA, AFP, CA15.3, CA19.9, CA125, CYFRA 21.1 e NSE su Modular E della ditta Roche Diagnostics e PSA, FPSA, TG, BMG e HCG su Immulite 2000 della ditta Medical Systems per 20 giorni consecutivi. Poiché non ci sono stati forniti i valori target per i suelencati analiti, abbiamo valutato la ripetibilità nel tempo ovvero l'imprecisione tra le serie calcolando per ogni analita la media ( $\bar{x}$ ), la mediana, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione percentuale (CV%). I valori ottenuti con le nostre determinazioni si sono distribuiti simmetricamente intorno al valore medio secondo una curva di tipo gaussiano in quanto casualmente distribuiti sia a sinistra che a destra della curva: media e mediana erano praticamente coincidenti. La valutazione della mediana, definita come valore rispetto al quale il 50% dei valori ottenuti risulta superiore e l'altra metà inferiore, è importante in quanto problemi di degradazione o concentrazione avrebbero determinato spostamenti significativi dalla media che però non si sono verificati. I coefficienti di variazione % ottenuti, che sono un indice della dispersione dei valori dal valore medio, sono generalmente contenuti in un'ordine del 5% fatta eccezione per il PSA libero e la Tireoglobulina dove viene raggiunto l'8% (vedi tabella sotto) a dimostrazione dell'ottima qualità dei controlli (ma anche dei dispositivi di misura)

**072****RISULTATI PRELIMINARI DI UN PROGRAMMA DI CONTROLLO (VEQ) PER TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT).**

Franceschetti F., <sup>1</sup>Conti M., <sup>2</sup>Filocamo M.  
 Az. Osp. Policlinico S.Orsola- Malpighi Bologna  
<sup>1</sup> Laboratorio Analisi Sezione Tossicologia, AUSL Ravenna  
<sup>2</sup> Laboratorio Analisi Sezione Tossicologia, AUSL Rimini

In collaborazione con il gruppo di studio "Farmacotossicologia clinica e doping" della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBIO), sezione regionale Emilia Romagna, è stato attivato nel 2004 un programma di VEQ sperimentale e gratuito per Transferrina Carboidrato carente (CDT).

A tutti i laboratori iscritti al Programma di VEQ (733) per Chimica Clinica e Immunometria è stato inviata una scheda con la quale si richiedeva la disponibilità a partecipare allo studio. Solo 23 laboratori, distribuiti in tutto il territorio nazionale, hanno confermato l'adesione. Al momento sono state effettuate 3 spedizioni per un totale di 7 campioni di controllo, ognuno dei quali costituito da siero di monodonnatore selezionato da centri specializzati. Come per gli altri programmi di VEQ, i campioni sono costituiti da matrice naturale non arricchita, spedita in forma congelata senza alcun trattamento. L'elaborazione è stata eseguita suddividendo i risultati in due gruppi: metodi immunometrici e metodi di separazione elettroforetica/cromatografica (elettroforesi capillare, HPLC).

**Primi risultati emersi:**

Dei 23 laboratori iscritti solamente 18 hanno fornito i risultati (78,3%), ottenuti con 10 diverse metodologie di dosaggio (7 immunometriche, 2 elettroforesi capillari e 1 con HPLC) utilizzando 12 differenti strumenti.

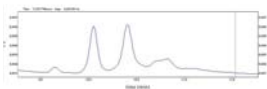
La valutazione dei dati risulta poi ulteriormente difficoltosa per la duplice modalità di espressione dei risultati:

- percentuale di isoforme di CDT (asialo, mono e disialo-transferrina) rispetto alla transferrina totale;
- percentuale di disialo-transferrina rispetto a tetrasialo-transferrina.

Per quanto attiene i livelli decisionali adottati per il discriminare tra bevitori occasionali e probabili bevitori abituali, i valori mediani osservati risultano rispettivamente del 2,6% e del 2,0%.

In generale si è osservata una corretta classificazione dei sieri. Per il campione di controllo **G003** (soggetto con **variante genetica**), **14 laboratori** che utilizzano metodi immunologici hanno refertato il campione (valori dal 10 al 20%) segnalando in due casi la necessità di conferma con altro metodo ed in cinque casi evidenziando esclusivamente l'opalescenza del campione. Solo **3 laboratori** (due con elettroforesi capillare e uno con HPLC) hanno correttamente riconosciuto il "caso clinico", di cui si allega il tracciato ottenuto con elettroforesi capillare.

Camp. G003: ferogramma della variante genetica eterozigote.

**073****CONCLUSIONE DELLA FASE DI SPERIMENTAZIONE DEL PROGRAMMA ECM: VALUTAZIONE PRELIMINARE**

Pascucci I., Borrelli\* M., Boschetti\* L., Cervasio\* L., Crivaro\* V., Galdieri\* A., Guarnaccia\* A., Guerriero\* V., Iovino\* V., Montella\* E., Noschese\* L., Paudice\* A., Vetrano\* F., Villari\* S., Sacchetti L.  
 Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche & CEINGE Biotecnologie Avanzate  
 \*Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva Dir. Prof. M. Triassi  
 Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Il nostro lavoro si propone, quasi alla fine della fase sperimentale del programma ECM, di ottenere informazioni sul grado di soddisfazione da parte di coloro che hanno seguito il programma ECM ed eventuali proposte di miglioramento.

È stato formulato un questionario organizzato in tre sezioni: - organizzazione degli eventi, -requisiti degli stessi, -suggerimenti. Sono state evidenziate alcune domande critiche-espressione di giudizi diretti- e, ipotizzando per queste domande una percentuale di risposte omogenee al 90%, è stata calcolata la dimensione del campione necessaria per ottenere un intervallo di confidenza pari a +/-5% (I.C. 95%): pari a 138 questionari. Sono stati intervistati i laureati afferenti ai Laboratori Analisi di Strutture Sanitarie pubbliche "tipo" della Regione Campania a diversa complessità: Osp. Cardarelli (Primario Dott. E. De Simone); Osp. di Maddaloni (Primario Dott. F.P. Del Monte), Osp. San Paolo (Primario Dott. B. Dente), Osp. S.Giovanni Bosco (Primario Dott. R. De Capoa); Osp. S.Maria delle Grazie (Primario Dott. R. D'Isanto); DAsMeLab AOU "Federico II", Primario Prof. F. Pane).

L'analisi dei risultati ha messo in evidenza:-tutte le Aziende hanno proposto, negli anni, programmi di formazione destinati al proprio personale; -spesso l'informazione non è risultata efficace e l'offerta formativa non ha coperto tutte le esigenze di aggiornamento percepite; -il personale ha, in media, una grande sensibilità per la formazione, spesso ricorrendo ad autofinanziamenti, a spostamenti fuori sede e, anche se in piccola parte, utilizzando giorni di ferie. Globalmente l'utenza è apparsa "mediamente soddisfatta" del programma ECM sinora svolto, anche se con l'evidente esigenza di approfondimento di tematiche specifiche. In conclusione il periodo di sperimentazione ECM può considerarsi positivo, ma proprio la sensibilità dei professionisti della Sanità nei confronti della Formazione continua deve stimolare le Strutture Organizzatrici a migliorare i programmi sia come tematiche da proporre che come metodologia didattica, integrando eventi come Congressi e Seminari con offerte di Corsi pratici, Stages presso altre Strutture e teledidattica.

Ministero della Salute Circolare 5 marzo 2002, n.DIRP 3°/AG/448

## 074

### IL CONTROLLO DI QUALITA'INTERNO IN VIROLOGIA : VALIDAZIONE BIOLOGICA DEGLI EMOCOMPONENTI

Bertolissi M., Olivieri M., Stecchina M., Catapano R.  
SIT ASS N° 2 Isontina – P.O. GORIZIA

**Scopo/obiettivo:** Introduzione di un run control indipendente certificato WHO (Ditta Diatech) da utilizzare nella validazione delle sedute analitiche per le indagini sierologiche e di biologia molecolare eseguite su tutti gli emocomponenti raccolti dal SIT: primi risultati.

#### **Materiali e metodi:**

**1- indagini di sierologia virologica:** 1° fase: analisi di 20 replicati di un pannello di sensibilità commerciale a 5 diluizioni di plasma per individuare la diluizione ottimale da utilizzare come run control (PeliCheck Multi-Marker Summit) per i test HBsAg, HCV-Ab, HIV1,2-Ab. 2° fase: analisi di 20 replicati della diluizione scelta per ogni singolo test ed elaborazione statistica con media e deviazione standard.

3° fase : utilizzo routinario del controllo indipendente (PeliSpy Multi-Marker) per la validazione delle sedute analitiche. Accettabilità del run control: valori compresi entro la media +/- 2DS, intervallo calcolato in fase 2. I dati di D.O. del run control sono tabulati e analizzati nel rispetto delle regole di Westgard: 1:2s; 1: 3s; 4:1s;10 x.

**2- indagini molecolari:**1° fase: scelta di un run control commerciale multimarker con caratteristiche simili ai pool testati e con un titolo di HCV-RNA di 100UI/ml, HIV-RNA di 278UI/ml, HBV-DNA di 51UI/ml che corrisponde a 2 - 3 volte il limite di sensibilità indicato dalla ditta produttrice. 2° fase : utilizzo routinario per la validazione delle sedute analitiche: il run control è accettabile per valori di D.O. > 1.0.

**Risultati:** dall'introduzione del run control per i test HBsAg, HCV-Ab, HIV1,2-Ab si sono avute 0/47 sedute analitiche invalide. Le regole di Westgard sono state violate in 2/47 sedute per HBsAg (mancato rispetto regola 10x), in 0/47 sedute per HCV-Ab e in 2/47 sedute per HIV1,2-Ab (mancato rispetto della regola 1:2s); a fronte del mancato rispetto di una regola di Westgard si sono intraprese azioni correttive tra cui la ricalibrazione dei test. Tali violazioni non erano rilevabili dalla sola esecuzione dei controlli del kit.

Dall'introduzione del run control per i test NAT (HCV-RNA, HIV-RNA, HBV-DNA) si sono avute 0/47 sedute analitiche invalide (si sono ottenuti sempre valori di D.O. > di 2.0 )

**Conclusioni:** l'introduzione del run control ci permette di valutare in tempo reale la stabilità del

sistema analitico ( errori casuali, errori sistematici, variabilità tra lotti diversi), in biologia molecolare inoltre permette di valutare l'efficacia della fase preanalitica di ultracentrifugazione dei pool, step non monitorato dai controlli del kit.

**Bibliografia:** Westgard Jo. Internal quality control: planning and implementation strategies. Ann.Clin.Biochem. 2003 nov; 40(Pt6): 593-611.

**075****A NOVEL BIOSENSOR FOR GLUCOSE  
CONTINUOUS MONITORING IN DIABETIC  
PATIENTS**

Ricci F.<sup>1</sup>, Moscone D.<sup>1</sup>, Poscia A.<sup>2</sup>, Valgimigli F.<sup>2</sup>,  
Messeri D.<sup>2</sup>, Palleschi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche,  
Università di Roma Tor Vergata, Rome, Italy,

<sup>2</sup> R&D Department, A. Menarini Industrie  
Farmaceutiche Riunite s.r.l., Italy

Glucose amperometric biosensors based on the use of Screen Printed Electrodes modified with an electrochemical mediator and glucose oxidase have been developed for the continuous monitoring of glucose.

The analytical parameters as well as the high stability of such biosensors make possible the conjunction with a microdialysis probe, for the prolonged continuous monitoring of subcutaneous glucose in diabetic patients using a portable instrument.

The biosensors present a high degree of reproducibility together with a low cost and the possibility of a mass-production.

The amperometric detection of glucose is based on the coupling of glucose oxidase enzyme, which catalyses glucose oxidation to gluconic acid and hydrogen peroxide, and an electrochemical mediator. This latter allows the detection of the hydrogen peroxide at low applied potential, highly limiting any electrochemical interference.

Glucose biosensors showed high sensitivity towards glucose. In a continuous flow system, the biosensors were able to detect glucose concentration as low as 25  $\mu$ M with a linear range up to 2 mM.

The biosensors showed a high stability in working conditions and storage stability. For storage stability the sensors were left dry at RT and after 1 year no loss of activity was observed. Glucose biosensors were also tested during 5 days (ca. 100 h) in a continuous flow mode (recording every 3 minutes) to evaluate their operational stability. A 0.5 mM concentration of glucose was continuously flowed into a wall-jet cell where the biosensor was placed and the current due to the hydrogen peroxide reduction was continuously monitored. After 100 h the signal drift was around 30%. For some biosensors the experiment was prolonged up to 10 days (ca. 200h). At the end of the test, the biosensors showed an average decrease of ca. 40%.

Results showing the coupling with the microdialysis and the biosensors tested in serum samples are also presented demonstrating the possibility for "in vivo" application. A recovery of glucose of ca. 10% was obtained thus allowing the detection of subcutaneous glucose between 0.25 and 20 mM. Moreover, no interferences signals were measured and also no negative effect on the operational stability of the biosensors was observed.

**076**

**PARAOXONASE GENE POLYMORPHISM (PON1 192) AND ENDOTHELIAL FUNCTION IN SUBJECTS WITH TYPE 2 DIABETES**

<sup>1</sup>Liberatoscioli L., <sup>1</sup>Mannucci L., <sup>1</sup>Cortese C. and <sup>1,2</sup>Federici G.

<sup>1</sup>Dept. of Laboratory Medicine, University Hospital "Tor Vergata" Rome, Viale Oxford 81, 00133 Roma,

<sup>2</sup>Bambino-Gesù Children's Hospital-IRCCS Laboratory of Clinical Biochemistry, P.zza S. Onofrio 4, 00165 Rome.

Endothelial dysfunction is frequent in diabetic subjects and is probably related to increased oxidation of circulating LDL. Paraoxonase (PON1) is an HDL-linked anti-oxidant enzyme whose capacity is influenced by a genetic polymorphism at codon 192 (Mackness B. et al., *Atherosclerosis* 1993). In the present study we have investigated the possible association between the PON1 polymorphism and the endothelial function in subjects with diabetes mellitus.

Sixty-nine patients with type 2 diabetes and 81 sex- and age-matched controls have been enrolled. The PON1 Gln192Arg polymorphism has been determined by PCR amplification and restriction analysis. Endothelial function has been evaluated as flow mediated vasodilation (FMD) of the brachial artery after forearm ischemia. Data have been analyzed according to the presence or absence of the Arg allele. Genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium and not different between patients and controls. Patients had higher prevalence of obesity and hypertension, but not hyperlipidemia, compared with controls. In controls no difference was observed in FMD between subjects homozygous for the Gln allele and those carrying the Arg allele. In diabetic patients, FMD was lower among those carrying the Arg allele ( $1.90 \pm 1.65\%$  vs.  $3.69 \pm 2.40\%$ ,  $p=0.02$ ). This difference became more marked after exclusion of subjects with hypertension ( $2.01 \pm 1.27$  vs.  $5.72 \pm 3.24$ ,  $p=0.01$ ). In multiple regression analysis, hypertension and PON1 gene polymorphism were independently and significantly associated with FMD. The present findings demonstrate a less impaired FMD in diabetic subjects homozygous for the Gln allele, consistent with a more effective antioxidant and supposedly protective action on circulating LDL of this isoform.

**077**

**RISPOSTA DELL'OSSIDO NITRICO ALL'IPERGLICEMIA: INDICE DI INTEGRITÀ FUNZIONALE ENDOTELIALE RESIDUA?**

Romitelli F., Chierici E., Dominici L., Carrozza C. e Di Stasio E.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica - Università Cattolica del Sacro Cuore - Largo F. Vito 1, 00168 - Roma

La regolazione del tono vascolare e l'inibizione dell'aggregazione piastrinica da parte dell'ossido nitrico (NO) prodotto dalle cellule endoteliali rivestono un ruolo di cruciale importanza nella genesi degli eventi fisiopatologici alla base dello sviluppo delle patologie trombotiche. In soggetti diabetici le complicanze microangiopatiche sono dovute al danno endoteliale indotto dalla glicosilazione proteica causata dall'iperglicemia. Allo scopo di determinare se i livelli di ossido nitrico siano predittivi dello stato funzionale endoteliale, i livelli di glucosio, insulina, nitrati e nitriti sono stati determinati in pazienti sottoposti a curva insulinemica dopo stimolo con carico orale di glucosio. Si sono evidenziati due differenti comportamenti: nel primo gruppo, non sono state osservate significative differenze nelle concentrazioni di NO (determinato con metodo di Griess) fino a 2 ore dall'assunzione di glucosio, nel secondo si verifica un incremento (2-5 volte) della concentrazione dell'ossido nitrico totale in corrispondenza del picco di glicemia. In questi ultimi pazienti, inoltre, la risposta insulinica risultava ancora presente con normalizzazione dei livelli glicemici dopo 2 ore. Nel primo gruppo, al contrario, nessuna variazione di concentrazione di nitrati e nitriti era determinabile. Inoltre la risposta insulinica risultava insufficiente con persistenza di elevati livelli di glicemia a due ore. Potrebbe così essere ipotizzato che il rilascio con azione antitrombotica di NO da parte dell'endotelio avvenga solo in fase di buon compenso metabolico laddove le cellule risultino ancora integre e capaci di opportuna sintesi del mediatore. Con l'instaurarsi della patologia, evidenziato dalla persistenza di iperglicemia dopo 2 ore e da una non consona risposta insulinica, in presenza di danni permanenti dell'endotelio, tali cellule perdono la capacità di produrre molecole protettive antiaggreganti e vasodilatanti. Ne consegue una diminuzione della concentrazione dell'NO e una mancata risposta allo stimolo iperglicemico. Il dosaggio dell'ossido nitrico potrebbe così essere indice dello stato funzionale endoteliale e rendere possibile il monitoraggio precoce dell'andamento della patologia prima dell'instaurarsi dei macroscopici effetti sistemici.

Milsom AB, Jones CJ, Goodfellow J, Frenneaux MP, Peters JR, James PE "Abnormal metabolic fate of nitric oxide in Type I diabetes mellitus" (2002) *Diabetologia* 45(11): 1515-22

**078****INTERACTION BETWEEN NITRIC OXIDE, URIC ACID AND OXIDATIVE STRESS IN THE PATHOGENESIS OF DIABETIC COMPLICATIONS**

\* Santini S.A., Pitocco D., Concolino P., E Di Stasio, Carrozza C., Capoluogo E., Zuppi C.

\*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza - S. Giovanni Rotondo, Catholic University School of Medicine Rome, Italy. e-mail: s.santini@operapadrepio.it

Diabetes reduces gender protection for cardiovascular disease in premenopausal women. The production of nitric oxide and the increase of oxidative stress is linked to the pathogenesis of diabetic complications. Nitric oxide, inhibiting xanthine oxidase activity (iNOS), reduces the production of an anti-oxidant as uric acid.

Our aim was to verify if the early phases of disease present an alteration of oxidative status linked to the interaction between nitric oxide and uric acid production.

20 type 1 diabetic (DM) uncomplicated females with < 10 years duration disease and 20 age-matched women as controls (C) were enrolled in the study. Conjugated dienes (CDs), lipid hydroperoxides (ROOHs), total plasma antioxidant capacity (TRAP), Nitric Oxide (NO), plasmatic and urinary uric acid (UAp and UAu), Glomerular Filtration Rate (GFR), HbA1c, HDL, LDL and triglycerides were measured. Compared with C, DM showed higher ROOH ( $8,1 \pm 1,9$  vs  $2,2 \pm 0,6$   $\mu\text{M}$   $p < 0,001$ ), CDs ( $0,036 \pm 0,003$  vs  $0,030 \pm 0,003$  A.U.  $p < 0,05$ ) and NO ( $14,1 \pm 5,6$  vs  $3,5 \pm 1,2$   $\mu\text{M}$   $p < 0,0001$ ) and lower TRAP ( $579,8 \pm 95,4$  vs  $930,1 \pm 84,2$   $p < 0,001$ ), UAp ( $2,8 \pm 0,5$  vs  $4,2 \pm 0,3$  mg/dL

$p < 0,0001$ ), UAu ( $9 \pm 3$  vs  $25 \pm 6$   $p < 0,0001$ ). GFR, HDL, LDL and triglycerides showed no differences.

Hyperglycaemia could promote, through the activation of NF- $\kappa\beta$ , the expression of iNOS. The increased generation of NO reduces AUp, AUu and consequently TRAP, at least in the early phase of diabetes when endothelium is healthy. With changes in oxidative status, linked to the decrease of AUp, and presence of other risk factors, endothelium is damaged, vascular NO activity wanes and the brake-on xanthine oxidase activity is removed with enhancement of uric acid, as observed in metabolic syndrome.

Hoeldtke RD "Nitrosative stress in early Type 1 diabetes". Clin Auton Res. 2003 Dec;13(6):406-21.

**079****DIABETES AS CO-DETERMINANT OF SOMATIC DNA DAMAGE IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE**

Manfredi S., Botto N., Federici C., Biagini A., Clerico A., Andreassi M.G.

CNR, Institute of Clinical Physiology, "G. Pasquinucci" Hospital, Massa, Italy

**Background.** Somatic DNA damage has been linked to coronary artery disease (CAD). However, whether genetic instability is linked to CAD per se or to concomitant potentially genotoxic metabolic and pharmacological factors remains still unclear.

**Aim.** To evaluate the determinants of somatic DNA damage in a large population of patients undergoing coronary angiography.

**Methods.** A total of 278 in-hospital patients (215 men, age  $61.8 \pm 0.7$  years) were studied by using micronucleus assay (MN) in human lymphocytes, which is one of the most commonly used biomarker for somatic DNA damage.

**Results.** Significant CAD (>50% diameter stenosis) was present in 210 patients (179 men, age  $62.3 \pm 0.7$  years). Normal coronary arteries were observed in 68 patients (35 men, age  $60.2 \pm 1.7$  years). There were no significant differences between patients with and without CAD, but patients with multivessel disease had the highest MN levels ( $P=0.01$ ). MN frequency was also found significantly higher in presence of type 2 diabetes ( $P < 0.0001$ ) and dyslipidemia ( $P=0.048$ ). On multivariate logistic regression analysis, diabetes [odds ratio = 6.8 (95% confidence interval, 3.2–14.5),  $P < 0.0001$ ] remained a significant determinant for the 50th percentile of MN (>12%).

**Conclusions.** These results indicated that diabetes is an important determinant of somatic DNA instability in patients with CAD. DNA damage might represent an additional pathogenetic dimension and a possible therapeutic target in the still challenging management of coronary artery disease concerning diabetics.

**080****TYPE 2 DIABETES AND ELEVATED SERUM HYDROPEROXIDE LEVELS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE**

Vassalle C, Boni C, Di Cecco P, Zucchelli GC.  
Institute of Clinical Physiology, CNR, Pisa, Italy.

Oxidative stress has a major role in the pathogenesis and development of different chronic and degenerative diseases, including diabetes and atherosclerosis.

**Aim:** To evaluate hydroperoxide levels (HP), as index of oxidative stress, in patients with diabetes and coronary artery disease (CAD).

**Methods:** Serum HP (d-ROMs Test, Diacron, Italy) were measured in 109 patients (89 males, age: 66±1 years, mean±SE). Subjects included 31 patients without and 78 with angiographically-proven CAD.

**Results:** The limit of quantification, defined as the concentration corresponding to the mean value of 10 determinations of the zero calibrator +2 SD resulted 62 arbitrary units (AU). The assay resulted linear over the range of 1–450 AU, with correlation coefficients greater than 0.99. Variation on replicate samples within or between days was lower than 6%.

HP resulted lower in No-CAD compared to CAD patients (341.5±20 vs 408±15.9 AU, p<0.05), and in patients without respect to those with diabetes (378±14 vs 426±29 AU, p=0.09). When subjects were grouped into two subsets, according to HP 75<sup>th</sup> percentile (472 AU), a stepwise increase in the prevalence of patients with HP levels above 75<sup>th</sup> percentile was observed, depending on the presence of CAD or diabetes, with highest prevalence in the group of subjects with combined presence of both diseases ( $\chi^2=11$ , p=0.004). Logistic regression analysis indicated that that gender, diabetes and CAD represented independent factors for elevated HP (Odds ratio, OR: 4.2, p=0.01; 3.5, p=0.016; 2.9, p=0.08, respectively). The interaction between CAD and diabetes on elevated oxidative stress was evaluated adding the product variable in a logistic regression model, and an OR of 8.7 (p=0.0004) was obtained.

**Conclusion:** Occurrence diabetes and CAD resulted important independent determinants of elevated HP, suggesting that the HP measurement might represent a new possible predictor and prognostic factor in the clinical setting.

**081****CHARACTERIZATION OF PANCREATIC CANCER (PC) DIABETOGENIC FACTOR: A 14 AA PEPTIDE OF THE N-TERMINAL SEQUENCE OF AN S-100 CA<sup>2+</sup> BINDING PROTEIN.**

Greco E.<sup>1</sup>, Basso D.<sup>1</sup>, Fogar P.<sup>2</sup>, Pucci P.<sup>3</sup>, Flagiello A.<sup>3</sup>, Baldo G.<sup>2</sup>, Giunco S.<sup>2</sup>, Navaglia F.<sup>1</sup>, Zambon C.-F.<sup>2</sup>, Falda A.<sup>1</sup>, Valerio A.<sup>4</sup>, Pedrazzoli S.<sup>2</sup>, Plebani M.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Laboratory Medicine, <sup>2</sup>Medical and Surgical Sciences, <sup>4</sup>Clinical and Experimental Medicine, University of Padova; <sup>3</sup>CEINGE Advanced Biotechnologies and Department of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Napoli; Italy

**Introduction:** PC-associated diabetes is consequent to the action of a tumor peptide less than 10,000 Da. Our aim was to identify the PC-associated diabetogenic peptide. **Methods:** Tumor homogenates from PC patients with (n=15) or without (n=8) diabetes, and normal pancreas homogenates (n=6) were subjected to 16.5% SDS-PAGE. After Comassie staining a band of approximately 1500 Da was evidenced in tumor tissues only from diabetic PC. This band was cutted and sequenced by automatic Edman degradation. **Results:** The sequence obtained revealed a 14 aa peptide of 1589,88 Da, corresponding to the N-terminal sequence of an S-100 calcium binding protein. This peptide was synthesised and its effects on glucose metabolism were tested in cultured C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblasts. These cells were cultured with different amounts (from 1 nmol/L to 2 mmol/L) of the 14 aa peptide. Glucose and lactate were measured in the supernatants after 24, 48 and 72 hours of incubation. In control myoblasts glucose concentration declined from 21.50 + 0.48 mmol/L (mean + SE) to 6.3 + 0.56, while lactate increased from 3.20 + 0.08 mmol/L to 34.50 + 1.24 after 72 hours of incubation. 50 nmol/L 14 aa peptide caused a significant reduction in glucose consumption and in lactate production after 72 hours of incubation with respect to control (Student's t test: t=3.87, p<0.05). At the same concentrations the 14 aa peptide caused also myoblasts phenotypic alterations (accumulation of cells at the periphery of culture wells, lack of differentiation in myotubes and presence of polynucleated cells). **Conclusions:** the N-terminal 14 aa peptide from an S-100 calcium binding protein is produced by PC causing diabetes mellitus; this peptide impairs glucose catabolism by myoblasts in vitro and this might determine hyperglycemia in vivo; its identification in patients' biological fluids might be helpful to diagnose PC when a recent onset diabetes mellitus occurs.

A. Valerio, D. Basso, P. Fogar, M. Falconi, E. Greco, et al. " Maldi-TOF analysis of portal sera of pancreatic cancer patients: identification of diabetogenic and antidiabetogenic peptides" *Clinica Chimica Acta* 2004;343: 119-127

**082****LA MICROALBUMINURIA IN PAZIENTI DIABETICI: QUALE CAMPIONE UTILIZZARE ?**

Amadei M.\*,Bergamaschi G.\*,Dazzi D.\*\*.,Donati M.\*,Frasanni M.,Previtali G.  
P.O. Fidenza-Vaio, via don Tincati, 43036 Fidenza (PR)  
\*Dipartimento di Patologia Clinica  
\*\* U.O. Prima Divisione Medica

**SCOPO DELLA RICERCA:**

Nei pazienti diabetici l'incremento di albumina urinaria (UAE) viene determinata come microalbuminuria (MA). La determinazione dell'albumina su campione di urine delle 24 ore costituisce il metodo di riferimento. Tuttavia tale raccolta pone notevoli problemi nei pazienti anziani, nei bambini ed è difficilmente praticabile nei pazienti ambulatoriali. Semplici alternative includono albumina/creatinina ratio (ACR) e la determinazione urinaria dell'albumina (UAC) su un unico campione estemporaneo del mattino. In questo lavoro abbiamo voluto verificare la possibilità di utilizzare l'ACR come alternativa alla MA su urine delle 24 ore e la possibilità di utilizzo di altre proteine urinarie nella valutazione del danno renale.

**METODI:**

Sono state analizzate le urine di nove pazienti di cui otto diabetici, cinque di tipo II, due di tipo I, un paziente con diabete secondario a terapia cortisonica ed un paziente normale, ma con familiarità per la malattia. Età media 56 anni (9-86).

Proteine come la cistatina C serica, MA, IgGU e alfa1-microglobulina sono state determinate con metodo nefelometrico (Beckman, Nephelometer Image). La creatinina serica e urinaria è stata determinata su uno strumento automatico con metodo Jaffè (LX20 Beckman Coulter Instrument). Il primo campione era rappresentativo delle urine delle 24 ore mentre i successivi erano campioni estemporanei del mattino.

**RISULTATI:**

Tutti i pazienti negativi o positivi per la presenza di MA su campione di urine delle 24 ore sono risultati rispettivamente negativi o positivi utilizzando ACR su campione di urine estemporaneo del mattino.

In tutti i campioni con micro o macroalbuminuria è stata evidenziata la presenza di un danno tubulare (alfa1-micro >14 mg/g di creatinina urinaria) e glomerulare (IgGU > 10 mg/g di creatinina urinaria). In questo gruppo il rapporto MA/IgGU è caratteristico per ogni singolo paziente ed incrementa con la gravità della proteinuria.

**CONCLUSIONI:**

La determinazione della MA su un campione estemporaneo del mattino (ACR) è una valida alternativa all'utilizzo di un campione delle urine delle 24 ore. La contemporanea determinazione di alfa1-microglobulina e di IgGU in pazienti con macro o microglobulinemia fornisce importanti indicazioni sull'entità del danno renale.

**BIBLIOGRAFIA:**

Viberti GC., et Alt.: Determinants of the penetration of proteins through the glomerular barrier. Diabetes 1983.

**083****COMPORTAMENTO DEI PARAMETRI EMATOLOGICI IN ATLETI CHE PARTECIPANO A MARATONE IN ALTITUDINE**

Banfi G<sup>1,2</sup>, Dolci A<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Galeazzi, Milano, <sup>2</sup>Facoltà di Scienze Motorie, Milano e <sup>3</sup>Multimedica, Milano

Stiamo seguendo da oltre dieci anni gli atleti che partecipano a maratone e ultramaratone in altitudine per studiare il comportamento degli indici ematologici al fine di evidenziare eventuali condizioni patologiche o para-fisiologiche che comportino la possibilità della cosiddetta anemia da sport. La valutazione qui presentata riguarda il periodo 1993 - 1998 in cui abbiamo raccolto dei campioni di sangue da 124 atleti in sette diverse gare; 23 atleti sono stati prelevati in più di un'occasione: 16 per 4 volte, 4 per 3 e 3 per 2 volte. Le analisi sono state effettuate, in genere presso il laboratorio, ma talora direttamente sul campo di gara. Gli analizzatori utilizzati sono Coulter Microdiff 18 e Coulter STKR regolarmente calibrati e verificati con sangue intero di controllo; tali analizzatori sono ora sostituiti da strumenti di nuova generazione Coulter AcT diff e LH 750. Le prescrizioni preanalitiche per l'ottenimento di dati corretti ed affidabili sono state seguite costantemente.

I valori pre- e post-competizione di eritrociti, emoglobina ed ematocrito non hanno evidenziato modificazione statisticamente significative negli atleti ( $4.75 \pm 0.35 \times 10^{12}/L$  pre,  $4.83 \pm 0.36 \times 10^{12}/L$  post;  $14.9 \pm 0.9$  g/dL pre,  $14.8 \pm 0.9$  post;  $43 \pm 2.5\%$  pre,  $43.1 \pm 2.18$  post).

Anche gli indici eritrocitari (MCV, MCH, MCHC) e l'ampiezza di distribuzione dei volumi eritrocitari (RDW) non venivano modificati dall'esercizio fisico intensissimo. I leucociti erano significativamente aumentati a causa del reclutamento similinfiammatorio tipico dell'esercizio fisico di durata ( $6.0 \pm 2.3 \times 10^9/L$  pre,  $13.2 \pm 3.5$  post).

Le piastrine e i relativi indici non sono modificati significativamente.

La stabilità dell'ematocrito e dell'emoglobina in atleti che effettuano allenamenti e competizioni in altitudine costituisce un criterio molto rappresentativo per l'utilizzo di tali parametri come un indice dello stato generale di salute e benessere e per evidenziare un'eventuale stimolazione anomala del midollo osseo.

## 084

### DETERMINAZIONE DELLA PROTEIN TIROSIN CHINASICA ZAP-70. ESPERIENZA DEL NOSTRO LABORATORIO.

Gioia F., Giani A., Palmeri D., Cione S.  
Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera Ospedale di  
"Circolo" di Busto Arsizio (VA) Presidio Busto  
Arsizio

**Obiettivo:** La Leucemia Linfatica Cronica (B-CLL) è una malattia eterogenea che presenta un decorso clinico variabile. Si è visto che l'espressione della presenza o dell'assenza della mutazione somatica della regione variabile delle immunoglobuline (IgVh) può essere utilizzata come marcatore prognostico della B-CLL. Infatti, B-CLL che esprimono ZAP-70 (gene non mutato) hanno un decorso clinico più aggressivo rispetto a quelle che non esprimono ZAP-70 (gene mutato). Per questo motivo abbiamo messo a punto la determinazione dello ZAP-70 in citometria a flusso.

**Materiali e metodi.** Strumento Citofluorimetro a flusso EPICS XL (Beckman Coulter), Kit "Fix & Perm" (Caltag Laboratories), anticorpi monoclonali anti ZAP-70 ALEXA FLUOR 488 (Caltag Laboratories), CD3 e CD56 PE (Beckman Coulter), CD19 ECD (Beckman Coulter), CD5 PC5 (Beckman Coulter), Isotipo Alexa Fluor 488 (Caltag Laboratories).

1. In una provetta Falcon da 5ml aggiungere 20 µl di CD19 ECD, 20 µl di CD5 APC, 5 µl di CD3 PE e 5 µl di CD56 PE e 100 µl di campione corrispondenti a  $1 \times 10^6$  cellule; 2. Agitare ed incubare 15' al buio a temperatura ambiente. 3. Aggiungere 100µl di Reagente A (medium di fissazione) del kit Fix & Perm, ed incubare per 15' al buio a temperatura ambiente; 4. Aggiungere 3 mL di PBS e centrifugare per 5' a 300 - 350 x g, eliminare il soprannatante e risospendere il pellet. 5. Aggiungere 10 µl di anticorpo monoclonale anti-ZAP-70 Alexa Fluor 488 e 100 µl del reagente B, (medium di permeabilizzazione), agitare la provetta, incubare per 20' al buio a temperatura ambiente; 6. Aggiungere 3 mL di PBS e centrifugare per 5' a 300 - 350 x g, eliminare il soprannatante; 7. Risospendere il pellet ed aggiungere 1 mL di PBS.

Seguendo la costruzione dei dot plot utilizzata da Crespo et al. (N.Eng.J.Med.2003 348:1764-75) si è definito un pannello di acquisizione. Sono stati scelti dei campioni di sangue periferico e midollare che esprimevano una popolazione CD19+CD5+, e sottoposti a marcatura con lo ZAP-70 ed analisi citofluorimetria secondo pannello di acquisizione prestabilito.

**Conclusioni:** Il problema di definire il limite di negatività o positività di ZAP-70 è stato superato utilizzando la negatività definita dall'acquisizione dell'Isotipo Alexa Fluor 488. La metodica messa a

punto si è mostrata di facile esecuzione e riproducibile, potendo così fornire un dato utile per inquadrare i pazienti con B-CLL.

**Bibliografia:** Crespo M., Bosch F., Villamor N., Belosillo B., Color D., Rozman M., Marcè S. López-Guillermo A., Campo E., Moserrat E. 2003 ZAP70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable region mutations in chronic lymphocytic leucemia. N.Engl.J.Med. 348:1764

**085****FALSA LEUCOCITOSI PER INTERFERENZA DA CRIOGLOBULINEMIA O PARAPROTEINEMIA**

Signori D., Rech V., Turrin M., Nemetz L., Pastega G., Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia. ULSS 2 - Feltre (BL)

**Introduzione.** Elevate concentrazioni plasmatiche di crioglobuline o paraproteine sono state descritte come causa di alterate conte leucocitarie e/o piastriniche con produzione di caratteristici grafici tecnologia-dipendenti (1). L'analizzatore Sysmex SE-9500 effettua la conta leucocitaria mediante due canali: Canale WBC (numero totale leucociti mediante rilevazione resistiva a temperatura ambiente, dopo utilizzo di un forte lisante, graficamente illustrati in un istogramma di distribuzione volumetrica bimodale) e Canale DIFF (linfociti, monociti e granulociti, dopo specifica lisi RBC e lisi differenziali WBC, mediante rilevazione resistiva a 33°C e radio frequenza per la struttura interna cellulare). Il conteggio è fornito se i due risultati concordano. L'esame emocromocitometrico eseguito senza formula leucocitaria (FL) fornisce il conteggio effettuato con il canale WBC.

**Scopo del lavoro.** Segnalare il riscontro di falsa leucocitosi in corso di paraproteinemie o crioglobulinemie quantitativamente elevate e le modalità operative per l'identificazione dei fattori che le influenzano e la correzione dei dati analitici.

**Materiali e Metodi.** Il sangue venoso periferico di tre pazienti affetti da mieloma multiplo e uno da LNH con crioglobulinemia II tipo viene sottoposto a esame emocromocitometrico con Sysmex SE-9500.

**Risultati.** I risultati forniti sono illustrati in Tabella.

Paraproteina	%	Canale WBC	Canale DIFF
IgM-K	32	---	3225/uL
IgA-L	33	145540/uL	7550/uL
IgA-K	57	---	5300/uL
IgM-kappa e policlionali IgG	Criocrito 20	32280/uL	16859/uL

Nei campioni si evidenzia un comportamento comune: mancata conta leucocitaria negli emocromi eseguiti con FL, leucocitosi negli emocromi eseguiti senza FL.

In questi pazienti, la presenza nel plasma in elevata quantità di immunoglobuline monoclonali causa un'interferenza nella conta leucocitaria effettuata nel Canale WBC, che provoca falsa leucocitosi e alterata distribuzione delle popolazioni leucocitarie nell'istogramma WBC o mancata espressione dei leucociti totali per l'elevata differenza nelle conte tra i due canali WBC e DIFF. Il valore ottenuto nel canale DIFF coincide con il conteggio microscopico.

**Conclusioni.** Leucocitosi elevate, alterata distribuzione dei leucociti nell'istogramma WBC, mancata conta dei leucociti con l'analizzatore Sysmex SE-9500 devono far sospettare paraproteinemia o crioglobulinemia, che andranno confermate con le indagini appropriate. L'esecuzione dell'emocromo con formula leucocitaria consente di ottenere in questi casi il conteggio leucocitario corretto, che è quello effettuato con il Canale DIFF.

**Bibliografia.**

1. Screening di crioglobulinemie con H\*1. D. Signori, R. De Rosa, F. Falcomer, P. Cappelletti. *Citoematologia e Automazione* 1, 3-5, 1991.

**086****VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ PER L'EMOGLOBINA A<sub>2</sub>: RISULTATI DI UNO STUDIO PILOTA CON SANGUE INTERO E METODICHE HPLC**

Paleari R.<sup>1</sup>, Giambona A<sup>2</sup>, Cannata M<sup>2</sup>, Leto F<sup>2</sup>, Maggio A.<sup>2</sup>, Mosca A.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano e <sup>2</sup>Unità Operativa Ematologia II con Talassemia, Azienda Ospedaliera "V. Cervello", Palermo.

**Introduzione.** La misura dell'emoglobina A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) rappresenta un test essenziale per lo screening dei portatori di β-talassemia. Purtroppo non si hanno dati aggiornati sulla attendibilità delle misure di laboratorio di questo parametro e quindi, in collaborazione con la So.S.T.E. (Società per lo Studio delle Talassemie e delle Emoglobinopatie, Palermo) si è provveduto ad effettuare uno studio pilota con campioni di sangue intero. L'unicità di questo studio consisteva anche nel fatto che tutti i centri che hanno partecipato all'esercizio utilizzavano metodiche HPLC di una sola Azienda.

**Materiali e Metodi.** Nel periodo di aprile 2005 sono stati analizzati, da parte di 48 laboratori affiliati alla So.S.T.E. e di diversi centri di microcitemia e talassemia, SIMT, laboratori di patologia clinica pubblici e privati, tre campioni di sangue intero in EDTA. Due dei tre campioni provenivano da donatore di sangue abituale (A) e da un genitore di un soggetto con morbo di Cooley con difetto beta-talassemico (B). Il terzo campione (C) era costituito da una miscela dei due precedenti. I campioni sono stati raccolti in sacche da donazione, aliquotati in sterilità in frazioni da 2 mL, e spediti per corriere a +4 °C entro tre giorni dalla raccolta. I laboratori, che utilizzavano sistemi HPLC della Bio-Rad Laboratories, dovevano analizzare i risultati entro 5 giorni dal ricevimento dei campioni.

**Risultati.** La distribuzione delle metodiche utilizzate dai partecipanti era la seguente: sistema D10, 4/48 centri; sistema Variant, 24/48 centri; sistema Variant II beta-tal, 8/24 centri; sistema Variant II dual-kit, 12/48 centri. I coefficienti di variazione globale riportati sui materiali analizzati andavano da 6,0 % (campione B, con HbA<sub>2</sub> media pari a 5,0 %) a 8,0 % (campione A, con HbA<sub>2</sub> media pari a 2,5 %). Per quanto riguarda l'accuratezza, con riferimento alle medie di consenso, si può dire che tutti i partecipanti hanno differenziato correttamente il campione A dal campione B, mentre 6 dei 48 centri hanno fornito per il campione C risultati sovrapponibili al limite superiore dei valori del campione A od al limite inferiore dei valori del campione B. Nessun centro ha riportato anomalie cromatografiche nei cromatogrammi dei campioni analizzati.

**Conclusioni.** Con riferimento agli attuali traguardi di variabilità analitica per l'HbA<sub>2</sub> si può concludere che questo esercizio è un buon punto di partenza per poter ridurre ulteriormente la variabilità interlaboratorio.

087

## ALTERAZIONE DELLA FLUIDITA' DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A DIALISI PERITONEALE.

Baquero Herrera C.J.<sup>a</sup>, Massaccesi L.<sup>a</sup>, Volmer Bertoli S.<sup>b</sup>, Ciurlino D.<sup>b</sup>, Goi G.<sup>a</sup><sup>a</sup>Dip. Chim. Biochim. Biotec. Med. Univ. Milano.<sup>b</sup> Unità di Nefrologia e Dialisi, Policlinico MultiMedica, Sesto San Giovanni, Milano.

**Scopo.** Lo stato infiammatorio che si instaura nei pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) è ritenuto il responsabile dell'aumento della patologia cardiovascolare riscontrata in questi soggetti. Lo stress ossidativo è ritenuto una concausa dell'instaurarsi dello stato infiammatorio ed è in grado di generare la perossidazione dei lipidi della membrana plasmatica delle cellule. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare, in un gruppo di pazienti in dialisi peritoneale (DP), la suscettibilità del globulo rosso allo stress ossidativo e lo stato infiammatorio dei pazienti.

**Metodologia.** Sono stati confrontati un gruppo di 18 pazienti in DP da almeno tre mesi (mesi di dialisi  $15 \pm 12$ , range 3-43), di età media  $64.6 \pm 16.6$  (range 29-89) di cui 10 erano in trattamento con dialisi peritoneale ambulatoriale continua (CAPD) e 8 in dialisi peritoneale automatizzata (APD) con un gruppo di 55 soggetti sani di controllo e di pari età ( $66.8 \pm 13.4$ , range 61-93). Sono state determinate le difese antiossidanti totali plasmatiche, i livelli plasmatici di idroperossidi e la fluidità della membrana del globulo rosso misurando l'anisotropia di fluorescenza. Inoltre sono state determinate la proteina C reattiva (PCR), l'albuminemia, KT/V residuo e peritoneale ed i test di equilibrio peritoneale.

**Risultati.** I pazienti hanno evidenziato, rispetto ai controlli, difese antiossidanti totali plasmatiche ridotte ( $P < 0.001$ ) ( $101.2 \pm 18.9$  vs  $137.0 \pm 39$ ); livelli plasmatici degli idroperossidi più elevati ( $P < 0.01$ ) ( $26.9 \pm 4.9$  vs  $24.0 \pm 3.5$ ); fluidità della membrana eritrocitaria (rs) aumentata ( $P < 0.001$ ) ( $0.182 \pm 0.007$  vs  $0.190 \pm 0.004$ ). I dati sono espressi come media  $\pm$  D.S. I pazienti con più mesi di trattamento in DP avevano una tendenza ad un aumento della fluidità di membrana del globulo rosso, ma non si è riscontrata una correlazione significativa con i parametri dello stress ossidativo. È stata riscontrata una correlazione significativa tra i valori di PCR e l'aumento di rigidità della membrana del globulo rosso ( $P < 0.006$ ;  $R = 0.613$ ). Nessuna correlazione tra i parametri dello stress ossidativo e test di equilibrio peritoneale.

**Conclusioni.** Le alterazioni della membrana eritrocitaria riscontrate nei pazienti con IRC in DP sono dovute in parte all'aumento dello stress ossidativo e in parte probabilmente allo stato uremico o ad altri fattori ancora sconosciuti. Queste osservazioni ci permettono di ipotizzare che le alterazioni osservate siano presenti anche sulle membrane delle cellule endoteliali dei vasi e quindi essere una concausa della patologia vascolare riscontrata in questi pazienti.

Goi G. et al. *Exper Gerontol* (2005) 40 ; 219-225.

088

## TALASSEMIE, VARIANTI DELL'EMOGLOBINA E INTERFERENZE IN HPLC: POSSIBILI PERCORSI ANALITICI ALTERNATIVI

Leone D.; Pancotto D.; Viaggi C.; Ivaldi G.

Laboratorio di Genetica Umana – Settore Microcitemia, Ospedali Galliera, Via A. Volta 6, 16128 Genova

Le linee-guida più recenti relative ai metodi e ai percorsi diagnostici di 1° livello delle emoglobinopatie concordano nell'indicare nell'HPLC il sistema analitico maggiormente affidabile per il dosaggio dell'Hb A<sub>2</sub>, dell'Hb F e per la valutazione qualitativa di eventuali altre frazioni anomale dell'emoglobina (Hb); oggi inoltre molti sistemi HPLC "dedicati" disponibili sul mercato prevedono anche la possibilità di dosare le frazioni glicate dell'Hb, in particolare l'Hb A<sub>1c</sub>. Nel nostro laboratorio abbiamo avuto la possibilità di osservare e caratterizzare oltre mille soggetti portatori di varianti Hb negli ultimi 10 anni; i sistemi HPLC utilizzati ( $\beta$  Thal. Short, Variant II Bio-Rad e HA8160 Menarini) in almeno 180 casi non hanno permesso la separazione e il dosaggio corretto di tali varianti Hb ma soprattutto non hanno consentito la valutazione quantitativa di almeno una delle componenti "normali" dell'Hb (A<sub>2</sub>, F e A<sub>1c</sub>) in quanto interferenti (coeluite), parzialmente o totalmente, con le stesse varianti. In letteratura sono descritte molte cause di interferenza nelle separazioni HPLC dell'Hb, anche se esistono notevoli differenze di comportamento tra i sistemi proposti dalle diverse Ditte, e nella pratica di tutti i giorni non è raro un tale riscontro, ecco allora la necessità di sviluppare dei metodi "alternativi" semplici e altrettanto affidabili per ottenere comunque delle informazioni sufficienti a garantire una diagnosi di 1° livello, almeno presuntiva, sulla quale impostare una conclusione diagnostica oppure prevedere ulteriori accertamenti funzionali o molecolari.

Pertanto sulla base dei diversi risultati non informativi ottenuti in HPLC possono essere standardizzati specifici test e soprattutto criteri interpretativi utilizzando tra l'altro:

- tecniche di separazione delle componenti Hb a pH diversi (prevalentemente in elettroforesi);
- test specifici (es. sickling test, termolabilità);
- valutazione dei parametri emocromocitometrici;
- opportuna valutazione della concentrazione della variante interferente espressa dal sistema HPLC;
- opportuna valutazione della concentrazione delle componenti fisiologiche dell'Hb, correttamente dosate, in relazione ad altri parametri disponibili;
- eventuale separazione delle catene globiniche;

Costruendo adeguati e razionali percorsi alternativi è stato possibile poter accertare o escludere, nella maggior parte dei casi, la presenza di difetti talassemici associati, il dosaggio delle diverse frazioni Hb e quindi pervenire ad una conclusione del 1° livello diagnostico.

**089****INCONGRUITA' DELLA RICHIESTA DI GRUPPI SANGUIGNI E PROVE CROCIATE IN REGIME ROUTINARIO E DI URGENZA.**

Bonacina A., Ardigò P.M., Montani A.N.  
Struttura Laboratorio Analisi di Casalpusterlengo e Codogno, A.O. Provincia di Lodi, Ospedale Civico, Via Marconi 1, 26840 Codogno, Lodi.

In conformità con le linee guida del Dipartimento Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera della Provincia di Lodi e considerando fondamentale un consenso univoco sui criteri di riferimento per l'utilizzo del sangue, degli emocomponenti e degli emoderivati, si è ritenuto utile analizzare la congruità delle richieste di gruppi sanguigni e di unità di sangue nei due Presidi Ospedalieri di Codogno e Casalpusterlengo. Il tutto al fine di concentrare interventi mirati a: ridurre i rischi correlati alla trasfusione, ad utilizzare i criteri clinici di buon uso del sangue e per creare strumenti di monitoraggio e di verifica.

Il periodo di rilevazione è stato di sei mesi (dal 01/08/2004 al 31/1/2005). La necessità di rilevare i seguenti dati e il periodo preso in considerazione derivano dal fatto che da questa data sono avvenuti dei significativi cambiamenti nei sopraccitati presidi ospedalieri. Sono stati trasferiti i reparti chirurgici e la rianimazione nel Presidio di Codogno; il laboratorio e la Sezione Trasfusionale sono stati unificati.

E' stata presa in considerazione l'attività chirurgica e il numero di posti letto per le Unità Operative Chirurgiche; il numero di posti letto per le Unità Operative mediche. Si sono prese in considerazione tutte le richieste di gruppi e di prove di compatibilità effettuate in regime di urgenza e di gruppi e prove di compatibilità effettuate in regime routinario.

Si è rilevato che il numero di richieste effettuate in urgenza è stato di 1048 unità di sangue e in routine di 541. Le unità trasfuse sul totale delle richieste è stato di 1065/1589 (67%). Per quanto riguarda le unità di sangue richieste in routine su un totale di 541 ne sono state trasfuse 378 (69.8%).

Per quanto riguarda le unità richieste in urgenza su un totale di 1049 ne sono state trasfuse 687 (65.5%).

In particolare reparti quali la Chirurgia Generale, l'Ortopedia e la Ginecologia presentano una percentuale di unità trasfuse su unità richieste relativamente basse (45.5% chirurgia, 57.8% ortopedia, 19.6% ginecologia).

Confrontando il numero di richieste di gruppo urgenti seguito da prove urgenti ne risulta una percentuale totale del 33.7%. Si tratta di un dato francamente basso (premesso che l'esecuzione della prova di compatibilità comporta sempre e comunque la ripetizione del gruppo in doppio) per giustificare una richiesta isolata del gruppo in urgenza.

In conclusione la proposta del laboratorio è di eliminare le richieste del gruppo isolato in urgenza per i motivi sopraddetti e di riportare le Unità Operative verso una più congrua richiesta di unità di sangue.

**090****LINEAGE-SPECIFIC CHIMERISM MONITORING MAY CONTRIBUTE TO DETECT MRD AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

Lisini D., Montagna D., Labirio M., Cristantielli R., Grignani P., Previderè C., Giorgiani G., Ballardini G., Locatelli F., Maccario R.

Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy; <sup>1</sup>Laboratorio di Ematologia Forense, Istituto di Medicina Legale, Università di Pavia, Pavia, Italy

One of the major cause of treatment failure in children with malignancies after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is represented by leukaemia relapse. All the therapeutic options to prevent or control relapse can have a better change to be effective if administrated in the presence of minimal residual disease (MRD). We have developed a methodological approach, with high sensitivity, to detect minimal amount of recipient cells. This is based on the flow cytometry analysis of immune phenotype of the original leukaemia clone, to detect one or more marker combinations that allow, after transplantation, the identification and immune-magnetic separation of a bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) selected cell subset enriched in leukaemia cells. Then the kinetics of donor/recipient chimerism has been assessed, by PCR-based amplification of a highly polymorphic short tandem repeat (STR) system, on both mononuclear cells from PB and/or BM samples and selected cell subsets. Post transplant samples from 28 patients with malignant haematological diseases were studied. Eight patients developed mixed chimerism (MC): two of them showed transient MC only in the selected cell subset and remain in complete remission, two showed MC in the selected cell subset earlier as compared to mononuclear cells from BM and/or PB samples and subsequently relapsed. The remaining patients developed a very quick relapse and did not show the critical transient stage of progressive MC. 20 patients exhibited full donor chimerism in mononuclear cells from PB and/or BM samples, as well as in the selected cell subset: 16 of them remain in complete remission; extra-haematological relapse occurred in two patients, while bone marrow relapse occurred in two patients, without prior detection of MC. However the time interval between the last follow-up and diagnosis of relapse was more than 3 months for both patients. The results of this study suggest that routinely performed donor/recipient chimerism analysis on a selected cell subset may contribute to increase MRD detection and facilitate rapid therapeutic decisions in patients with malignant haematological diseases given allogeneic HSCT.

Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M et al. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. Bone Marrow Transplant. 2000; 25: 843-851

## 091

### REFERTAZIONE PER IMMAGINI IN EMATOLOGIA.- TELEMEDICINA

Autori : Sale M.; Rubattu L.; Cherchi G.B.  
Unità operativa: Diagnostica Ematologica  
Laboratorio di Analisi Ospedale Civile "SS.ma Annunziata" Sassari

L'utilizzo degli strumenti di informazione in ambito sanitario è sempre più diffuso.

Lo studio e la ricerca devono rappresentare insieme all'esperienza, la base preliminare per l'utilizzo di tutte le informazioni strumentali ai fini diagnostici.

Scopo del lavoro: Completare il referto ematologico con immagini del preparato microscopico, comunicando così in maniera più chiara la patologia in esame.

Materiali e metodi: Sono stati acquisiti da Aprile a Giugno 2005 20 campioni di sangue periferico e 10 di sangue midollare provenienti sia da pazienti ospedalizzati che ambulatoriali. Lo strumento ematologico utilizzato è ADVIA 2120 Bayer, il microscopio Olympus BX 40 e la macchina fotografica digitale Olympus CAMEDIA C-5050 .

Risultati: L'utilizzo del microscopio con fotocamera digitale ha permesso la realizzazione di un referto ematologico con immagini supportando e completando il commento diagnostico del preparato.

La casistica selezionata è costituita dai seguenti casi: LLC, LMA, MM, virosi, parassita malarico.

Conclusioni: I risultati ottenuti, confortati dal parere positivo dei colleghi, ci fanno presagire che tale innovazione possa essere utile per una migliore collaborazione fra laboratoristi e clinici.

L'implementazione progressiva dei sistemi finalizzati alla gestione dei dati clinici, viene quindi condivisa tra strutture sanitarie operanti in vaste aree.

Futuri sviluppi: Telemedicina . E' nel nostro programma l'invio dei referti con immagini per via telematica, con possibilità di teleconsulto, per medici situati in località diverse, su un caso clinico analizzando il maggior numero di informazioni possibile.

Creazione di un archivio digitale, con possibilità per ogni singolo paziente di documentare fotograficamente l'evoluzione del relativo caso clinico.

Bibliografia: Della Mea V., "Applicazioni di Telemedicina", Rivista Elettronica di Neuroscienze, 1999.

## 092

### UTILITA' DELLA DETERMINAZIONE DEL GALATOMANNANO (PLATELIA ASPERGILLUS) DA BAL IN UN CASO DI ASPERGILLOSI POLMONARE IN UN PAZIENTE IMMUNOCOMPROMESSO.

Marchese A.E.°, Beretta S.\* , °Bonaccorsi V.°, Catalano D.,Chinnici L.°, Di Dio G.,La Rosa A.°, Politi M.G.°,Schinocca L.\* , Sciacca M.°, Vinci F.°, Milone G.\*

\* Divisione di Ematologia Ferrarotto , Azienda V. Emanuele ,Ferrarotto e S. Bambino, Catania.

° Laboratorio Analisi P.O.S. Bambino, Azienda V. Emanuele ,Ferrarotto e S. Bambino, Catania.

**Scopo:** Noi qui riportiamo il caso clinico relativo ad un paziente affetto da "probabile AI" nel quale la positività del GM da BAL è stata l'unica indagine che ha confermato la diagnosi clinica di AI a localizzazione polmonare. L'Aspergilloso invasiva è una malattia a localizzazione prevalente polmonare, del paziente immunodepresso che è provocata dal fungo filamentoso ASPERGILLUS come via di ingresso le vie aeree. **Metodologia e risultato :** Il galattomannano (GM) è un costituente del genus ASPERGILLUS la cui rilevazione tramite ELISA è utilizzata per la diagnosi di Aspergilloso invasiva (AI). L'antigene GM può essere rivelato da siero, urine, liquor Cefalorachidiano o ancora da fluido ottenuto da lavaggio bronco-alveolare (BAL). Non è ancora chiara la utilità di questi differenti materiali biologici nella ricerca del GM in pazienti affetti da sospetta AI a localizzazione polmonare. Un paziente di anni 52, era trovato affetto da LMC e dopo alcuni mesi di trattamento andava incontro a crisi blastica di tipo linfoide. Per tale condizione era trattato con chemioterapia citostatica di tipo ARA-C ad alte dosi e MITOXANTRONE. Durante l'aplasia midollare che seguiva tale schema di trattamento il paziente sviluppava febbre. Il quadro febbrile era resistente al trattamento antibiotico, nessuna positività emoculturale era riscontrata,. Al quarto giorno di febbre il paziente era sottoposto a TAC ad alta definizione sul torace che evidenziava una opacità polmonare a sinistra in sede linguolare, tale opacità era circondata da "halo sign" un reperto che evoca la AI. Il paziente era quindi sottoposto a broncoscopia e a lavaggio bronco-alveolare, il fluido di lavaggio era utilizzato oltre che per la citologia anche per le seguenti ricerche: Esame batterioscopico, Esame colturale batteriologico, Colorazioni per Pneumocistis carinii, Esame colturale per Aspergillus, Ricerca antigeni per legionella e micoplasmi. Dal fluido ottenuto da BAL era inoltre ricercato il GM tramite assay immunoenzimatico di

092

tipo sandwich, PLATELIA ASPERGILLUS (BIORAD). L'unica indagine positiva risultava essere il riscontro di GM sul BAL la ricerca colturale e citologica per aspergillus essendo invece negative, anche i dosaggi del GM nel siero condotti a cadenza settimanale dall'inizio del trattamento citostatico, erano negativi. Il decorso successivo era caratterizzato dalla risposta alla terapia antimicotici sistemica e dalla comparsa della escavazione tipica della AI evidenziata al controllo radiologico. **Considerazioni conclusive:** Il nostro case report sottolinea la necessità di utilizzare precocemente in tutti i pazienti con alterazioni polmonari compatibili con la AI l'indagine TAC con lavaggio broncoalveolare e la ricerca del GM da BAL.

Becker e al. (Br J. Haematol. 2003) hanno recentemente riportato dati che sostengono questo opinione. Nella loro casistica infatti su 12 pazienti affetti da AI polmonare ben 5, pari al 45%, presentavano positività del GM su BAL e da negatività quando questo antigene era ricercato sul siero.

093

### CORRELATION BETWEEN INSTRUMENTAL ALARM CELL COUNTER SYSMEX XE-2100 AND LATEX MONOTEST: OUR EXPERIENCE

Di Mele A.L., Faricelli R., Dragonetti D., F. Peri F, Dadorante V., Esposito S., Filippi G., Millevolte C. Quaranta M.

Clinical Pathology - SS. Annunziata Hospital – Chieti

**Objectives** We have considered patients older than 8 years who have got mononucleosis. This diagnosis is based on values obtained from emocromo.

We have estimated:

- Positive cases for lymphocytes and monocytes with negative EBV-Monotest, which is confirmed by blood smear under the microscope.
- Verification of % of lymphocytes and monocytes in the patients with positive monotest.
- Verification of the patients with high % of monocytes and negative monotest for mononucleosis, in these cases crossed control with EBV in enzyme immunoassay.

**Observations:** When the monotest for mononucleosis is positive we have observed that % of lymphocytes is higher than % of monocytes, for example: 60 % lymphocytes - 12% monocytes.

**Materials and methods:** First verification is on DIFF channel; when there are suspicion alarms, is used search channel of the white cells (channel closely technical). DIFF channel: the surfactant which is contained in lisant reagent 4-DL causes the lisi of the Erythrocytes and the Piastrine, at the same time pierces the cytoplasmic membrane of the Leucocytes. The polimetinic colouring which is contained in lisant reagent 4-DS penetrates into the membrane of leucocytes and binds itself to nucleic acids and the cytoplasmic organs, whose intensity of fluorescence, after  $\lambda = 633$  nm excitation, allows us to evidence those cells that produce signal of suspicion. An organic acid, always contained in the lisant reagent 4-DL, binds itself specifically to grains in the eosinophiles allowing their differentiation from the neutrophil ones by the greater intensity of side scatter signal.

The DIFF channel confirms the presence of activated shapes linfomonocytoids which are present in the premature phase of the mononucleosis. This is verified by blood smear and mononucleosis latex test. In fact the results from the patients show a greater positivity for mononucleosis in those patients who show high % of lymphocytes and normal % of monocytes.

**Conclusions** Therefore the DIFF channel has to be carefully observed in the estimation of the cytogram of several patients. In fact, it gives an accurate indication of the % of several parameters and therefore a useful approach for diagnosis. Specifically for the mononucleosis we have assessed a positivity over a particular % of lymphocytes on DIFF channel.

**094****APPROPRIATEZZA NELLA RICERCA DI EMOGLOBINA A2: LE DUE FACCE DEL PROBLEMA**

Dellora C, Bertani G, Piccotti S, Pollarolo P, Tornotti G, Zeno L, Bardone B, Bellomo G  
Laboratorio RR CC, Ospedale Maggiore della Carità, Novara

**Background:** La ricerca di emoglobina A2 (HbA2) rappresenta uno degli aspetti della medicina di Laboratorio in cui emergono criticamente problemi di appropriatezza. In alcuni casi la richiesta appare ingiustificata ed in altri, a fronte di un quadro emocromocitometrico suggestivo non viene effettuato l'approfondimento diagnostico.

**Scopo della ricerca:** Valutare, quantitativamente, l'entità della inappropriata richiesta di dosaggio di HbA2 ed ipotizzare un algoritmo diagnostico atto a minimizzare la stessa

**Metodologia:** L'esame emocromocitometrico è stato condotto su campioni di sangue intero in K<sub>3</sub>EDTA su analizzatore Sysmex SE 9500. La cromatografia dell'emoglobina è stata condotta su cromatografo Variant II Bio-Rad.

**Risultati:** In un anno solare sono pervenute al Laboratorio 867 richieste di dosaggio di HbA2. Di queste, solamente 108 (12.45 %) hanno evidenziato valori di HbA2 francamente anomali (> 3.5 %). L'analisi dei casi positivi, nel loro complesso ha evidenziato (nel 92 %) contemporaneamente MCV<75 fL, MCH<25 pg ed MCHC>31 g/dL. L'utilizzo di questi parametri come criterio di selezione ha evidenziato che solo 9 dei 744 casi negativi (1.2 %) risultava incluso.

Sono stati quindi analizzati gli emocromi di 16882 pazienti consecutivi, non selezionati, e di questi ne sono stati isolati 720 (4.26 %) che presentavano MCV<75 fL, MCH<25 pg ed MCHC>31 g/dL. Su due campioni rappresentativi di tale ultima popolazione (100 casi) e della restante popolazione (100 controlli) è stato effettuato il dosaggio di HbA2 che ha evidenziato una positività (HbA2>3.5 %) del 68 % nei casi e dello 0 % nei controlli.

**Conclusioni:** I risultati ottenuti dimostrano come l'appropriatezza nella richiesta di HbA2 potrebbe essere aumentata dal 12.45 % al 68 % applicando la combinazione di MCV<75 fL, MCH<25 pg ed MCHC>31 g/dL. Utilizzando lo stesso criterio potrebbero inoltre essere selezionati pazienti per i quali non viene specificamente richiesto il dosaggio di HbA2 ma in cui è facilmente ipotizzabile la presenza di HbA2. Tale popolazione risulta pari al 2.89 % della popolazione che afferisce al Laboratorio.

**Riferimento:** Joutosky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA: HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: A study of 60.000 samples in a clinical Diagnostic Laboratory. *Clinical Chemistry* 50, 1736-1747, 2004

**095****SVILUPPO DI UN SISTEMA DI RIFERIMENTO PER LA MISURA DELL'EMOGLOBINA A<sub>2</sub>**

Paleari R.<sup>1</sup>, Caruso D.<sup>2</sup>, Bissè E.<sup>3</sup>, Schaeffer C.<sup>4</sup>, Diemer H.<sup>3</sup>, Van Dorsselaer A.<sup>4</sup>, Mosca A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche e <sup>2</sup>Dip. di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dip. di Chimica Clinica, Ospedale di Friburgo (D); <sup>4</sup>Laboratorio di Spettrometria di Massa bio-organica, Strasburgo (F).

**Introduzione.** La misura dell'emoglobina A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) rappresenta un test essenziale per lo screening dei portatori di β-talassemia. A tal fine è necessario poter disporre di metodiche altamente accurate e riproducibili in quanto, a causa della notevole eterogeneità nei fenotipi, le differenze nei valori di Hb A<sub>2</sub> tra soggetti normali e patologici possono essere molto ridotte. Inoltre, la mancanza di un metodo di riferimento e di calibratori comuni per le diverse metodiche analitiche comporta una notevole variabilità inter-metodo nella misura della Hb A<sub>2</sub>. A questo riguardo la Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha approvato la formazione di un Gruppo di Studio con il compito di sviluppare un sistema metrologico completo per la misura della Hb A<sub>2</sub> che comprenda un metodo definitivo e materiali di riferimento primari e secondari.

**Materiali e Metodi.** Il metodo di riferimento è basato sulla misura mediante spettrometria di massa (ESI-MS) di peptidi specifici delle catene δ e α ottenuti mediante digestione enzimatica (con tripsina o Lys-C) delle emoglobine eritrocitarie. Per la preparazione dei calibratori primari, le emoglobine A<sub>2</sub> e A<sub>0</sub> sono state purificate a partire da sangue di donatore mediante tre passaggi cromatografici successivi su cellulose a scambio ionico.

**Risultati.** Per la digestione con tripsina sono stati identificati, sulla base delle caratteristiche di massa, intensità del segnale e tempo di ritenzione, due peptidi caratteristici per le catene δ e α che corrispondono, rispettivamente, al peptide 18-30 (VNVDAVGGGALGR, m/z 1256) ed al peptide 32-40 (MFLSFPTTK, m/z 1071). Per la digestione con Lys-C sono stati isolati i peptidi specifici δL10 e αL9.

La purezza delle emoglobine A<sub>0</sub> e A<sub>2</sub> utilizzate per la preparazione dei calibratori primari è risultata uguale, rispettivamente, a 98.7 % e 99.3 % (HPLC a scambio ionico). I pesi molecolari stimati sulle emoglobine purificate e l'analisi delle loro mappe peptidiche ha confermato l'identità di tali proteine in accordo con quanto riportato nelle banche dati.

**Conclusioni.** Il lavoro finora svolto consentirà di proseguire nella definizione e validazione del metodo di riferimento ed in seguito di contribuire al raggiungimento della standardizzazione delle misure della Hb A<sub>2</sub> e al miglioramento dell'accuratezza nella diagnosi dei portatori di β-talassemia.

**Bibliografia.** Weatherall DJ. The thalassemia syndromes. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication 1981.

**096**

COMPOSTO ETEROZIGOTE TRA Hb S E Hb G PHILADELPHIA IN PRESENZA DI ALFA TALAS-SEMIA (DEL-3.7/-3.7) IN DUE DONNE NIGERIANE

Mangione M.<sup>1</sup>, Ivaldi G.<sup>2</sup>, Collell M.<sup>1</sup>, Palisi A.<sup>1</sup>, Murtas R.<sup>1</sup>, Mediate D.<sup>1</sup>, Monteleone M.<sup>1</sup>, Parodi M.I.<sup>2</sup>, Leone D.<sup>2</sup>, Leone L.<sup>1</sup>

(1) Dip. Patologia Clinica. S.C.Genetica Molecolare.

A.O. OIRM-S.Anna, P.zza Polonia 94, 10126 Torino.

(2) Lab.Genetica Umana-Microcitemia, Ospedali Galliera, Via A.Volta 6, 16128 Genova.

Da quando nel 1949 Pauling descrisse il tracciato elettroforetico dell'emoglobina S (Hb S), sono state descritte oltre 800 varianti Hb e i loro relativi profili cromatografici ed elettroforetici.

Le interazioni tra Hb S e varianti delle catene beta globiniche possono produrre fenotipi clinici anche molto importanti (con Hb D, Hb E, Hb O Arabia), mentre quelle con le varianti delle catene alfa esprimono in genere fenotipi clinicamente silenti ma possono produrre composti ibridi di non facile interpretazione all'elettroforesi o in cromatografia.

Nel 2004 giunsero in tempi diversi al nostro laboratorio (Torino) due pazienti entrambe di origine nigeriana, di cui una al secondo trimestre di gravidanza, per l'analisi dell'assetto emoglobinico in quanto soggetti di coppie a rischio. I parametri ematologici evidenziarono spiccata microcitosi e la separazione cromatografica mediante HPLC mostrò la presenza di tre picchi anomali distinti in entrambe: un picco corrispondeva ad Hb S, dopo la conferma mediante test di sickling, gli altri risultavano di difficile interpretazione anche dopo elettroforesi a pH alcalino e acido. Per una maggiore informazione si sono separate le catene globiniche mediante HPLC ma per una opportuna identificazione dei difetti Hb presenti (strutturali ed eventualmente talassemici) è stata eseguita l'analisi molecolare presso il laboratorio di Genetica Umana di Genova. Con tali indagini si sono potuti concludere i due casi accertando la presenza di Hb S allo stato eterozigote, Hb G Philadelphia (alfa68 Asn→Lys) allo stato eterozigote e la presenza di Alfa Talassemia da delezione (-3.7Kb) allo stato omozigote. La presenza di difetti strutturali delle catene alfa e delle catene beta globiniche ha pertanto dato luogo alla formazione del composto ibrido corrispondente al picco cromatografico aggiuntivo visto in HPLC. Il partner della paziente incinta presentava Hb S allo stato eterozigote: il figlio analizzato nel primo giorno di vita aveva l'Hb S pari al 6.5%, compatibile con la presenza della variante allo stato eterozigote.

Krauss, JS "The proportion of hybrid heterodimers in homozygous or doubly heterozygous beta chain variant hemoglobinopathies associated with alpha chain hemoglobin variants". Ann.Clin.Lab.Sci. 2000 Oct; 30 (4) : 391-4.

**097**

CONFRONTO FRA DUE METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA VES IN PAZIENTI CON MIELOMA

Mercurio S.\*; Balboni F.; Salati A.; Fanelli A.\*; Caporale R.\*; Burbui S.; Innocenti F.; Rossetti M.\*; Sarandria M.L.; Bellesi G.P.; Sastrucci S.\*; Statello M.\*; Marrani G.\*; Gallai R.\*; Papi C.\*; Stefanelli S.\*; Bernini M.\*

\*Laboratorio Generale, Dip. Diagnostica di Laboratorio AOU-Careggi Firenze

Laboratorio Analisi e U.O. Ematologia IFCA Firenze

La determinazione della VES trova utilità nel monitoraggio di una vasta gamma di condizioni cliniche in cui si ha un disturbo delle proteine plasmatiche. Il metodo di riferimento per misurare la VES è quello di Westergren.

L'analizzatore automatico TEST 1 (Alifax, Padova) utilizza un sistema di lettura basato sulla fotometria capillare quantitativa. In questo lavoro abbiamo preso in esame una patologia in cui il rilevante innalzamento della VES assume carattere diagnostico, e abbiamo confrontato i valori ottenuti dal TEST 1 con un metodo derivato Westergreen, il Sedimatic 100 (Dasit, Milano)

ventiquattro pazienti affetti da mieloma afferenti all'U.O. Ematologia, omogenei per età e per sesso, sono stati analizzati con Sedimatic 100 e con TEST 1.

I risultati ottenuti sono presentati in tabella

097

N°	Mieloma	Test 1	Sedimatic	Media	differenza
1	Secernente	102	134	118	-0,31
2	Secernente	120	91	105,5	0,24
3	Non sec.	41	19	30	0,54
4	Secernente	88	62	75	0,30
5	Secernente	120	157	138,5	-0,31
6	Secernente	89	67	78	0,25
7	Secernente	103	86	94,5	0,17
8	Secernente	98	84	91	0,14
9	Non sec.	75	86	80,5	-0,15
10	Secernente	38	19	28,5	0,50
11	Secernente	33	25	29	0,24
12	Secernente	62	78	70	-0,26
13	Secernente	65	42	53,5	0,35
14	Extramid.	46	24	35	0,48
15	Non sec.	68	68	68	0,00
16	Secernente	78	22	50	0,72
17	Secernente	120	149	134,5	-0,24
18	Secernente	12	5	8,5	0,58
19	Secernente	94	123	108,5	-0,31
20	Secernente	60	148	104	-1,47
21	Secernente	36	28	32	0,22
22	Secernente	69	39	54	0,43
23	Secernente	92	81	86,5	0,12
24	Secernente	112	155	133,5	-0,38

L'analisi di Bland-Altman mostra una buona correlazione fra i metodi. Sono solo due i casi discordanti (3,10), positivi con il TEST 1 (cut off 30 mm) e negativi con il Sedimatic (cut off 20 mm), ciò può essere dovuto ad un'inaccurata definizione del cut-off di riferimento o a problemi di precisione del metodo. In conclusione, i dati mostrano che la metodologia introdotta con TEST 1 è ben correlata con il metodo derivato Westergreen.

098

### ZAP-70, CD38 E STATO MUTAZIONALE DEL GENE IGVH NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

Colombo C.; Besana S.; Tramacere P.; Signorini S.; Beretta M.; Mocarelli P.; Perego P.(1).  
Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio,  
Via Mazzini 1, 20033 Desio (Mi).

(1) Divisione di Medicina Ospedale di Desio

**Introduzione:**La LLC ha un andamento clinico eterogeneo e i sistemi di stadiazione attualmente in uso non sono in grado di predire il decorso della malattia fin dal suo esordio.Nella ricerca di fattori prognostici, particolare importanza ha assunto lo studio dello stato mutazionale del gene IgVH in quanto,se non mutato, è associato a prognosi peggiore(1,2)

**Scopo:**Valutare la correlazione tra stato mutazionale del gene IgVH ed i suoi test surrogate (espressione dell'antigene di superficie CD38 e di ZAP-70 citoplasmatico) nonché la loro validità quali indici prognostici.

**Materiali e metodi:** Sono stati indagati 28 soggetti affetti da LLC in cura presso la Divisione di Medicina del nostro ospedale. L'espressione di CD38(Beckman Coulter) e ZAP-70(Caltag laboratories) e' stata testata mediante tecnica citofluorimetrica (Coulter Epics XL-MCL), mentre lo stato mutazionale del gene IgVH mediante sequenziamento automatico (AbiPrism 310). I test CD38 e ZAP-70 sono stati considerati positivi se gli antigeni erano espressi in più del 20% dei linfociti B; la soglia di omologia del gene IgVH è stata posta al 98%(V-BASE).

**Risultati:**Il 28%(8/28) dei pz. analizzati presenta il gene IgVH non mutato(omologia>98%) e di questi rispettivamente il 62%(5/8) ed il 25%(2/8) risultano positivi per ZAP-70 e CD38.Negatività di espressione per i due antigeni si è verificata nell'85% dei soggetti con IgVH mutato.In base a questi dati la sensibilità di ZAP-70 è risultata del 63% e la specificità dell'81% mentre per CD38 rispettivamente del 25% e dell'86%. Dal punto di vista clinico soggetti ZAP-70 positivi hanno registrato nell'83%(5/6) dei casi un raddoppio dei linfociti entro due anni dalla diagnosi seguito da un ulteriore raddoppio nella maggior parte dei casi(3/5).Solo il 55%(5/9) dei pz.ZAP-70 negativi hanno registrato invece un raddoppio nello stesso periodo di tempo,mai seguito da un secondo.

#### Conclusioni:

ZAP-70 è fortemente correlato all'andamento clinico della malattia e più debolmente allo stato mutazionale di IgVH; CD38 non mostra alcuna correlazione con questi parametri. I nostri dati sono in linea con quanto descritto in letteratura seppur con una diversa sensibilità nei test probabilmente dovuta alla differente numerosità e caratteristiche specifiche della popolazione analizzata.

#### Bibliografia:

- 1)R.Schroers et al. Leukemia 2005;19:750-58.
- 2)N.Chiorazzi et al. N.Engl.J.Med 2005;352:804-15.

**099****CONSIDERAZIONI SUL CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO PER ANALITI TIROIDEI.**

Giani A., De Francesco D., Cione S., Mainini V., Gioia F.

Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera <<Ospedale di Circolo di Busto Arsizio (VA)>>.

**scopo:** I dosaggi degli ormoni FT3, FT4, TSH rappresentano gli esami di tipo ormonale più richiesti nel nostro Laboratorio. Si analizzano i risultati del controllo di qualità interno per un periodo di 6 mesi per valutare la qualità analitica di questi dosaggi.

**materiali e metodi:** Sieri per controllo di qualità interno DICOCARE (CARE S.r.l) Genova, TIR1 e TIR2, a due livelli di concentrazione per ogni seduta analitica; pool interno del Laboratorio di 20 sieri di pazienti con funzionalità tiroidea normale, senza anticorpi antitiroidei, aliquotato e congelato a -80°C. Gli esami di funzionalità tiroidea sono eseguiti con metodo chemiluminescente (CLIA) e con uno strumento IMMULITE 2000-MEDICAL SYSTEMS (Genova) **risultati: CV analitico intraserie:** FT3=6.5%; FT4=8.2%;TSH=6.2%.

**CV analitico tra-serie per FT3**

	N°	Media	DS	CV analitico
<b>TIR 1</b>	98	3.38	0.34	10.0%
<b>TIR 2</b>	93	6.79	0.67	9.8%
<b>POOL</b>	63	2.60	0.20	7.6%

**CV analitico desiderabile** dovrebbe essere <4%. Errore totale analitico per TIR1=17.1%; per TIR2 =19.1%: **l'errore totale analitico accettabile** dovrebbe essere **12.1%**. La **differenza critica** per FT3=33.4%.

**CV analitico tra-serie per FT4**

	N°	Media	DS	CV analitico
<b>TIR 1</b>	97	2.17	0.17	7.8%
<b>TIR 2</b>	93	4.06	0.34	8.3%
<b>POOL</b>	67	1.20	0.08	6.7%

**CV analitico desiderabile** dovrebbe essere <3.8%. Errore totale analitico per TIR1=15.0%; per TIR2 =17.6%: **l'errore totale analitico accettabile** dovrebbe essere **9.9%**. La **differenza critica** per FT4 è 29.8%.

**CV analitico tra-serie per TSH**

	N°	Media	DS	CV analitico
<b>TIR 1</b>	98	6.60	0.39	5.9%
<b>TIR 2</b>	92	2.78	0.15	5.3%
<b>POOL</b>	66	3.20	0.14	4.4%

**CV analitico desiderabile** dovrebbe essere <9.7%; Errore totale analitico per TIR1=16.7%; per TIR2 è 12.8%: **l'errore totale analitico accettabile** dovrebbe essere **22.8%**. La **differenza critica** per TSH è 55.7%.

**conclusioni:** Il traguardo analitico è raggiunto per il solo TSH ma non per FT3 e FT4, i cui CV analitici restano però all'interno dei CV <<stato dell'arte>> della VEQ regionale. Gli esami di funzionalità tiroidea, visto lo stato attuale, sono sicuramente da richiedere secondo le indicazioni del PIANO NAZIONALE LINEE GUIDA (2004) dell'Istituto Superiore di Sanità.

**bibliografia** Ferraro S. et al: Ligand Assay 9(3) 2004

**100****IPERPROLATTINEMIA E  
MACROPROLATTINEMIA**

Szymczuk S., Tura M., Filocamo M., Bovicelli R., Cavina C., Galeazzi M., Nicolini A., Ceroni V.  
U.O. Medicina di Laboratorio – Ospedale Infermi  
Via Settembrini, 2 – 47900 Rimini

Le iperprolattinemie costituiscono il più comune disordine ipotalamo-ipofisario riscontrabile in clinica. Possono essere dovute a molteplici cause, alcune fisiologiche come gravidanza e allattamento, altre di natura iatrogena indotte da farmaci, oppure sono il sintomo di neoplasie, aneurismi, adenomi e malattie granulomatose; inoltre l'iperprolattinemia sia in donne che uomini, costituisce una delle principali cause di sterilità. Tuttavia un risultato di iperprolattinemia può essere dovuto ad un certa quota di prolattina biologicamente inerte per cui il risultato del dosaggio viene a dipendere dal test immunologico adottato. La prolattina infatti circola nel siero sotto diverse forme molecolari: la forma monomerica "little" da 23 KD è quella presente in concentrazione maggiore (circa 80%), seguita dalla forma dimerica "big" da 50KD (circa 15-20%) e infine dalla forma tetramerica "big big" da 160 KD (fino a 5%). Queste ultime due forme tendono a legarsi con immunoglobuline di classe G aumentando il peso molecolare e venendo eliminate dal rene più lentamente: si determina così iperprolattinemia dovuta a macroprolattinemia. La diagnosi corretta nei pazienti con iperprolattinemia dovuta a macroprolattinemia è estremamente importante in quanto una positività esclude trattamenti terapeutici inutili ed indagini aggiuntive. Per questo il dosaggio della macroprolattina va sempre associato laddove vi sia una prolattina elevata. Nel nostro laboratorio abbiamo iniziato ad eseguire il dosaggio da gennaio 2004 utilizzando come discriminante un valore normale di forme macro fino al 30%. Per valori di prolattina  $\geq 30$  ng/ml abbiamo proceduto alla estrazione delle forme big con PEG 6000 e a ulteriore dosaggio utilizzando sia per la prolattina che per la macroprolattina il metodo in elettrochemiluminescenza della ditta ROCHE. A tutt'oggi in quasi 18 mesi, a fronte di 516 pazienti con valori di prolattina elevata abbiamo evidenziato circa un 21% di casi (108 pazienti) di macroprolattinemie. I clinici del nostro nosocomio hanno accolto positivamente il dosaggio della macroprolattina nonché la gestione del dosaggio di macroprolattina, che non viene richiesta a priori dal medico ma aggiunta dal laboratorista ogniqualvolta si trova di fronte ad un valore aumentato. Inoltre l'introduzione del dosaggio della macroprolattina ha contribuito a ridurre i dosaggi seriatati di prolattina (spikes) diminuendo il disagio al paziente e aumentando nel contempo l'efficacia diagnostica della prolattinemia.

**Esperienza di Rimini nel dosaggio della macroprolattina** Tura M., Filocamo M., Babboni A., Bovicelli R., Cavina C., Galeazzi M., Nicolini A., Szymczuk S.; Il Patologo Clinico n. 3-4/2004.

**101****DOSAGGIO DEL PTH INTATTO: CONFRONTO  
TRA UN METODO RADIOIMMUNOLOGICO E  
UN METODO IN CHEMILUMINESCENZA.**

Giani A., De Francesco D., Cione S., Mainini V., Gioia F.  
Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera <<Ospedale  
di Circolo di Busto Arsizio (VA)>>.

Il paratormone (PTH) è un polipeptide di 84 aminoacidi, secreto dalle ghiandole paratiroidi necessario per la regolazione dei livelli di ioni calcio e fosforo circolanti. L'iperparatiroidismo secondario è clinicamente rilevante nei pazienti con insufficienza renale cronica, in cui l'aumento del PTH tende a normalizzare i valori della calcemia mobilizzando calcio dall'osso, fino ad osteolisi e sostituzione fibrosa del tessuto osseo stesso.

**scopo:** introduzione, nel nostro Laboratorio, di un nuovo test in chemiluminescenza per il dosaggio del paratormone intatto, in precedenza eseguito con metodo radioimmunologico.

**materiali e metodo:** Campioni di siero di pazienti dializzati e non, conservati in bagno di ghiaccio dopo il prelievo, centrifugati a +4°C entro 30 minuti e refrigerati a -20°C fino alla determinazione.

Dosaggi con metodo chemiluminescente (CLIA) INTACT PTH-IMMULITE 2000-MEDICAL SYSTEMS-(Genova) che utilizza un anticorpo policlonale per la regione N-terminale (1-34) coniugato con fosfatasi alcalina e un anticorpo monoclonale caoattato alla fase solida per la regione C-terminale (44-84) [Intervallo di riferimento: 11-67 pg/ml] e con metodo radioimmunologico (IRMA) INTACT PTH ASSAY-SCANTIBODIES LABORATORY, Inc (USA) che utilizza un anticorpo policlonale per la frazione (1-34) marcato con  $^{125}$ I e un anticorpo policlonale (39-84) in provette sensibilizzate [Intervallo di riferimento: 3-55 pg/ml].

**risultati:** N° pazienti 66; Range di concentrazione 1.4-1923.0 pg/ml; Retta di regressione di Passing e Bablok  $y=1.46x+46.8$ ; coefficiente di correlazione lineare di Pearson  $r=0.99$ ; coefficiente di determinazione  $R^2=0.9549$ .

Ottima correlazione tra i due metodi nel range di concentrazione analizzato ma, considerando arbitrariamente il metodo radioimmunologico come metodo di riferimento, il kit IMMULITE 2000 presenta una sovrastima dei valori di PTH attesi.

**conclusioni:** E' noto da tempo che i frammenti di PTH non 1-84, soprattutto nei pazienti dializzati, nei quali la clearance di essi è ridotta, interferiscono nei dosaggi del PTH intatto.

Questo comporta problemi clinici diversi soprattutto nella gestione dei pazienti dializzati e ribadisce il problema della mancanza di uno standard internazionale di riferimento per i diversi tipi di dosaggio e di un intervallo di riferimento diverso per i pazienti dializzati.

**bibliografia**

Marangella M. et al. G Ital Nefrol 2002, 19: 467-475  
Brancaccio D. et al. G. Ital. Nefr. 2003, 20 (s. 24): 83-95

**102****LINKAGE BETWEEN I172N MUTATION AND A NEW SNP IN INT6 OF CYP21B GENE: A GENETIC STUDY OF SARDINIAN FAMILY.**

Concolino P.; <sup>2</sup>Satta M.A.; <sup>1</sup>Santonocito C.; <sup>1</sup>Carrozza C.; <sup>1</sup>Rocchetti S.; <sup>1</sup>Ameglio F.; Gardina B.; <sup>1</sup>Zuppi C.; <sup>1</sup>Capoluongo E.

<sup>1</sup> Laboratory of Clinical Molecular Biology, Department of Biochemistry & Clinical Biochemistry and <sup>2</sup>Departments of Endocrinology and Clinical Surgery- Catholic University, Rome, Italy.

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a genetic disorder due to 21-hydroxylase deficiency. More than 90% of CAH cases are caused by mutations of CYP21B gene, most of which are the result of microconversion events between the functional gene and its pseudogene.

Using a combination of RFLP and direct sequencing analyses, we describe the genetic study of a Sardinian family carrying I172N mutation in linkage with a novel SNP namely 1636 Int6. Nine members of a Sardinian family, three of which affected by 21-hydroxylase deficiency, were tested by direct sequencing analysis of CYP21B gene. The finding of a new Int6 single nucleotide polymorphism (SNP), always in homozygous with the specific I172N mutation in these three patients, suggested to screen the remaining members of the family by means of Int 6 1636 SNP restriction analysis (BsaI enzyme). Results: in all subjects, we obtained three different restriction patterns. By means of direct sequencing analysis we found that the wild type subjects (absence of I172N mutation) did not present the novel SNP, while the I172N heterozygous had also the new SNP in heterozygous. A third different pattern was that belonging to homozygous I172N mutated patients carrying in homozygous the Int6 1636 SNP. Conclusions: The characterisation of new polymorphisms in CYP21B can improve the analysis of segregation of CYP21B mutated alleles especially in genetic familial studies. The analysis of linkage between specific mutations and the new discovered SNPs, especially if focused on genetic familial studies, may improve and simplify the quality of genetic analysis of 21-hydroxylase deficiency.

**103****WHOLE/INTACT PTH E MARKERS DI ATTIVITÀ OSSEA IN PAZIENTI EMODIALIZZATI: QUALI VANTAGGI NELLA PRATICA CLINICA?**

Dominici L.<sup>1</sup>, Vulpio C.<sup>2</sup>, Santini S.A.<sup>3</sup>, Spada P.L.<sup>2</sup>, Panocchia N.<sup>2</sup>, Di Stasio E.<sup>1</sup> e Carrozza C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica e <sup>2</sup>Clinica Chirurgica Serv. Emodialisi - Università Cattolica Sacro Cuore - Largo F. Vito 1, 00168 - Roma; <sup>3</sup>IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza - Laboratorio analisi - V.le Cappuccini, 71013 - S. Giovanni Rotondo (FG).

Il dosaggio del PTH e dei suoi frammenti rappresenta un emergente problema clinico-laboratoristico. Alcuni metodi (intact-PTH) sono poco specifici poiché dosano sia l'intera molecola attiva (PTH<sub>(1-84)</sub>) che i suoi frammenti, fra i quali il PTH<sub>(7-84)</sub> che sembrerebbe svolgerebbe un'azione inibitoria sull'osso.

Sono stati quindi introdotti metodi di dosaggio selettivo della molecola intatta 1-84 (whole-biointact-PTH) e la differenza fra l'intact-PTH ed il primo esprimerebbe in modo indiretto la quota di PTH<sub>(7-84)</sub> circolante. Recentemente Monier-Fauger et al., hanno riscontrato una buona capacità predittiva del PTH ratio [PTH<sub>(1-84)</sub>/PTH<sub>(7-84)</sub>] nelle diverse forme di osteodistrofia renale (ODR): valori >1 correlano con quadri istologici di osteodistrofia ad alto turn over, mentre valori <1 con quadri di Adynamic Bone Disease (ABD). Tale parametro è stato proposto quale indice di valutazione per il monitoraggio clinico e terapeutico della ODR in alternativa alla biopsia ossea, invasiva e dolorosa per il paziente. Scopo del presente lavoro è verificare se e quali relazioni esistano fra il PTH ed i suoi frammenti, ed alcuni markers biochimici del turn over osseo. In 64 pazienti emodializzati (37 maschi e 27 femmine, età media di 57±16 anni) sono stati dosati contestualmente: osteocalcina (OC), β-crosslaps (BCL), 25(OH)D<sub>3</sub>, calcemia corretta per albuminemia (Ca<sub>corr</sub>), fosfatemia (Pi), fosfatasi alcalina (PA), intact-PTH (Roche) e whole-biointact-PTH (Nichols).

L'intact-PTH, il PTH<sub>(1-84)</sub> e il PTH<sub>(7-84)</sub> (ottenuto per differenza tra i due) correlano positivamente ed in modo analogo con OC, BCL, PA. Esiste una correlazione di diverso grado fra il Pi e le varie forme di PTH, mentre non sono state riscontrate correlazioni fra le varie forme di PTH e la 25(OH)D e la Ca<sub>corr</sub>. Al contrario non si è evidenziata alcuna correlazione fra i suddetti parametri e il PTH<sub>(1-84)</sub>/PTH<sub>(7-84)</sub> che, pertanto, non sembra di alcuna utilità clinica nella gestione e monitoraggio biochimico di attività ossea. Per valutare se i frammenti del PTH svolgano un ruolo attivo nella genesi della ABD sono necessari ulteriori studi che utilizzino il dosaggio diretto dei frammenti del PTH.

Santini SA, Carrozza C, Vulpio C, Capoluongo E, Luciani G, Lulli P, Giardina B, Zuppi C "Assessment of parathyroid function in clinical practice: which parathyroid hormone assay is better?" *Clin Chem.* (2004) 50(7):1247-50

**104****APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA DI TEST PER LO SCREENING DELLA FUNZIONALITÀ TIROIDEA.**

Ciola P., Greco G., Tundo S., Pannofino A., Vinci E.  
U.O.C. Patologia Clinica, P.O. Ostuni-Fasano, AUSL Brindisi/1 72015 Fasano (Brindisi)

**Scopo del lavoro:** Le affezioni endocrine più frequenti sono rappresentate dalle tireopatie, la cui diagnostica è basata sui dati di laboratorio (Raccomandazione B, Livello IIA). I medici clinici richiedono frequentemente i tre test di funzionalità tiroidea (TSH, FT4 e FT3) come primo inquadramento diagnostico e come screening della possibile patologia tiroidea. Lo scopo del presente lavoro è la revisione dei risultati dei test tiroidei, richiesti secondo la suddetta logica diagnostica, al fine di valutare l'appropriatezza della richiesta rispetto alle specifiche Linee Guida ed all'efficace utilizzo delle risorse economiche disponibili.

**Materiali e metodi:** Nel presente lavoro abbiamo sottoposto a revisione un campione di 10.244 soggetti adulti (> 16 anni) di ambo i sessi (F 71,5% e M 28,5%) afferenti al ns. laboratorio nel 2004 per effettuare i tre test di test di funzionalità tiroidea (TSH, FT4 e FT3), come primo inquadramento diagnostico e come screening della possibile patologia tiroidea.

I predetti test sono stati effettuati con kit di 3° generazione. e i relativi risultati sottoposti a revisione secondo le specifiche Linee Guida per le tireopatie.

**Risultati:** possono così essere sintetizzati:

- L' 86,2% della popolazione indagata presentava un TSH nei limiti degli intervalli di riferimento (LIR); in tale campione di popolazione in nessun caso sono stati documentati valori di FT3 significativamente anomali.
- Il 13,8% della popolazione indagata presentava TSH anomalo ( il 8,5% TSH al disotto del LIRI e il 5,3% al di sopra del LIRS)

**Discussione:** I risultati della nostra revisione confermano la validità delle specifiche LG, che prevedono:

- l'effettuazione di THS3G come test di screening,
- la determinazione di FT4 per la diagnosi di iper/ipotiroidismo con segni e sintomi clinici assenti o conclamati,
- la determinazione di FT3 solo nei rari casi di ipertiroidismo con iperinnalzamento prevalente di questo ormone

L'attuazione delle suddette Linee Guida contribuisce all'appropriatezza clinico-diagnostica dei test tiroidei ed all'efficienza gestionale con l'ottimizzazione delle risorse economiche.

**Bibliografia:** 1).Singer PA, Cooper DS, Levy EG, et al. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *JAMA* 1995; 273:808-812.

2)Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN, et al. American Thyroid Association Guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. *JAMA* 1990;263:1529-1532.

**105****IPOVITAMINOSI D NELLA POPOLAZIONE DIALIZZATA: QUALI I FATTORI CONDIZIONANTI?**

Vulpio C.<sup>2</sup>, Di Stasio E.<sup>1</sup>, Carrozza C.<sup>1</sup>, Spada P.L.<sup>2</sup>, Giungi S.<sup>2</sup> e Zuppi C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. di Bioch. e Bioch. Clinica e <sup>2</sup>Clin. Chirurgica Serv. Emodialisi – U.C. S.C. - Largo F. Vito 1, 00168 - Roma

Le recenti osservazioni sull'incremento di ipovitaminosi D nella popolazione anziana e con insufficienza renale cronica hanno riproposto le problematiche inerenti i metodi di dosaggio, range di normalità e le correlazioni dei gradi di insufficienza di tale ormone con osteomalacia, osteoporosi e iper-PTH. Nei pazienti emodializzati ulteriori fattori, terapia con calcitriolo, chelanti del Pi, bilancio Ca/Pi, iper-PTH, malnutrizione e scarsa attività fisica ed esposizione al sole, complicano il quadro. Nel presente studio su una popolazione di 64 emodializzati (37 maschi e 27 femmine; età 57±16 anni) differenti parametri di funzionalità ossea e metabolica sono stati dosati nel 2003 e ripetuti a un anno di distanza. In tale periodo tutti i pazienti sono stati sottoposti ad emodialisi trisettimanale con soluzione dializzante contenente 1.5 mmol/L di Calcio, hanno seguito una dieta libera ed assunto Calcio Carbonato, chelanti del fosforo e calcitriolo, secondo le linee guida DOKI. I livelli sierici di osteocalcina, β-crosslaps, calcemia corretta per albuminemia, fosfatemia, fosfatasi alcalina, intact-PTH, whole-biointact-PTH non hanno mostrato significative variazioni nel lasso di tempo in esame. Al contrario, nell'intera popolazione, nel 2004 si è registrato un significativo incremento medio di 25(OH)vit-D di 8.7±4.1 ng/ml rispetto al 2003 (p<0.00001) che non è risultato correlato alla assunzione di calcitriolo né ad una variazione dei markers ossei. Le percentuali di pazienti suddivisi per classi di ipovitaminosi nel 2003 e 2004 sono risultate:

	Ipo-D Severa	Ipo-D Lieve	Normali
anno	< 10 ng/ml	11 – 20 ng/ml	>20 ng/ml
2003	82%	10%	7%
2004	31%	49%	21%

Parallelamente si è assistito ad una significativa diminuzione della calcemia, da 9.6±0.8 a 9.1±0.6 mg/dl (p<0.00001) ed un incremento della albuminemia (p<0.028) che si riflettevano in una significativa diminuzione (p<0.0001) del rapporto Calcio/Albumina. I risultati ottenuti potrebbero essere dovuti ad un miglioramento dello stato nutrizionale del paziente con evidenti riflessi sulla assunzione di vitamina D e della albuminemia; resta da chiarire se la riduzione della calcemia eserciti un ruolo nella regolazione della sintesi di 25(OH)vit-D.

Gomez-Alonso C, Naves-Diaz ML, Fernandez-Martin JL, Diaz-Lopez JB, Fernandez-Coto MT, Cannata-Andia "Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25(OH) D cut-off level" *JB Kidney International* (2003) 63(s85): 44-48.

**106****DETERMINAZIONE INTRAOPERATORIA DEL PARATORMONE: PROBLEMI INTERPETRATIVI**

Carrozza C., \*Raffaelli M., \*Traini E., Serva P., \*Bellantone R., Zuppi C.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, \*Divisione di Endocrinochirurgia – Università Cattolica del Sacro Cuore – Largo F. Vito 1, 00168 - Roma

L'uso del PTH intraoperatorio ha rappresentato negli ultimi anni un valido aiuto per accertare la completa rimozione chirurgica del tessuto paratiroideo iperfunzionante. La definizione di "caduta significativa" del PTH non è a tutt'oggi standardizzata e di fatto si fa riferimento a Irvin che per primo ne ha dato una descrizione.

Una caduta della concentrazione di PTH circolante di almeno il 50% rispetto al valore basale a 5 minuti dall'asportazione del tessuto ghiandolare iperfunzionante, viene riconosciuta come espressione della riuscita dell'intervento.

Nella nostra realtà la determinazione del PTH viene effettuata direttamente in sala operatoria all'induzione dell'anestesia, in pre-exeresi, a 5 e 10 minuti post-exeresi e nei casi dubbi a 20 minuti con kit Stat-intraoperative-intact PTH della Future Diagnostics commercializzato da Pantec .

Descriviamo il caso di una donna di 72 anni sottoposta a intervento con tecnica minivasiva per adenoma paratiroideo sn evidenziato in fase pre-operatoria con localizzazione scintigrafica concordante con quella ecografica.

Valore basale del PTH 632 pg/ml

Manipolazione 3231 pg/ml

A 5' dall'asportazione 158 pg/ml

La caduta di gran lunga superiore al 50% sia rispetto al valore basale che al valore più elevato raggiunto lasciava pensare ad una completa rimozione chirurgica.

Un ulteriore prelievo a 20 minuti dall'intervento evidenziava una risalita del PTH intraoperatorio a 479 pg/ml. L'esplorazione chirurgica bilaterale con asportazione di una paratiroide controlaterale iperplastica faceva cadere il valore del PTH a 130 pg/ml e poi a valori normali.

A differenza dei casi di adenoma singolo, in presenza di doppio adenoma o di iperplasia, la determinazione intraoperatoria del PTH può dare dei risultati falsi positivi con riduzioni anche superiori al 50% nei primi cinque minuti dall'asportazione chirurgica.

La riduzione dei falsi positivi più che con un aumento della soglia percentuale della caduta del PTH, può essere ottenuta allungando i tempi di determinazione.

Irvin GL, Deriso GT. A new, practical intraoperative parathyroid hormone assay. *Am J Surg* 1994; 168:466-8

**107****IL TEST COMBINATO: VALUTAZIONE DEI RISULTATI**

Del Frate G.\*; Bruzzi R.\*; Panichi M.\*; Danesi B.; Manetti P.°; Giuntini A.°; Rossi R.; Kemeny A.; Santucci A. Moscardo S.\*

\*Laboratorio di Analisi Biochimico-Cliniche e Microbiologiche ASL1

°U.O. Ginecologia Massa

U.O. Ginecologia Carrara

**Introduzione.** Dal marzo 2003 il laboratorio dell'ASL1 in collaborazione con i ginecologi delle due U.O. di Ostetricia e Ginecologia esegue il test combinato.

Il test combinato è un test di screening basato sulla combinazione della tranlucenza nucale (NT) e del dosaggio dei livelli plasmatici della free  $\beta$ -hCG e della PAPP-A correlati con l'età materna.

**Materiali e metodi.** La metodologia adottata prevede la determinazione dell'età gestazionale mediante la misurazione della distanza vertice sacro e la misurazione in triplo della NT. I dosaggi della free  $\beta$ -hCG e della PAPP-A sono eseguiti con strumentazione automatica in chemiluminescenza. L'elaborazione dell'indice di rischio è effettuata con software dedicato PRISCA e il cut-off adottato di 1:250.

Il test è stato eseguito su 1719 gestanti tra la 9 e la 13 settimana + sei giorni, di cui 226 di età > 35 anni, 1493 di età < a 35 anni.

**Risultati.**

Su 1719 test eseguiti 81 sono risultati positivi di cui 75 falsi positivi, 6 veri positivi, nessun falso negativo.

La percentuale dei falsi positivi risulta del 4.3%, inferiore al 5% come previsto dal UK National Screening Committee e l'OAPR (odds of being affected with positive result) cioè il rapporto delle probabilità di feto affetto rispetto a quella di feto non affetto con test positivo di 1:13.

**Conclusioni.** Sono state eseguite 81 amniocentesi contro le 226 previste. Le patologie diagnostiche sono 4 anomalie cromosomiche, due casi di trisomia 21 e due casi di trisomia 18 più un atresia esofagea e un caso di spina bifida..

I risultati della nostra esperienza confermano che il ricorso alla amniocentesi esclusivamente in base all'età materna andrebbe abbandonato.

**Bibliografia**

Dugoff L. The association between first trimestre maternal serum PAPP-A and free-beta hCG concentrations and obstetric complications-population based screening study.

*Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:S79

**108****IDENTIFICATION OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR IN HUMAN SPERMATOZOA**

\* Fiore C., \*Sticchi D., \* Pellati D., ° Forzan S, \* Bertoldo A., \* Armanini D.

\*Department of Medical and Surgical Sciences – Endocrinology, University of Padova, via Ospedale 105, 35129 Padova; \*Laboratorio di Analisi, Ospedale Piove di Sacco, via S. Pio X 1, 35100 Padova

Oxidative stress, caused by an excessive generation of reactive oxygen species (ROS), has recently been considered as one of the probable causes of defective sperm cell function.

Several studies have demonstrated that aldosterone can induce oxidative stress, which is most evident at the level of cardiovascular system.

Aim of our study was to evaluate the presence of the MR in human spermatozoa, since several studies have related the decline of male fertility to oxidative stress.

All assays were performed with freshly ejaculated sperm from healthy donors (6 male, age range 21-35 years recruited from the staff of the Department of Medical and Surgical Sciences of University of Padua), obtained by masturbation after 3 days of sexual abstinence. Spermatozoa were isolated by Percoll gradient and RNA was extracted by using a commercial Kit. The expression of MR was performed by Real-Time PCR using specific primers. An aliquot of the isolated spermatozoa was used for immunohistochemistry and immunofluorescence analysis by using a specific monoclonal antibody against the steroid binding domain.

The immunohistochemistry and immunofluorescence analysis shows a positive-staining both in spermatozoa and MNL, which were used as positive controls. MR expression was also seen in spermatozoa and MNL by Real Time PCR. The amount of MR mRNA expression was lower in spermatozoa than in mononuclear leukocytes.

We have now demonstrated by immunohistochemistry, immunofluorescence and by Real-Time PCR the presence of MR in human spermatozoa. Since spermatozoa are sensitive to changes in electrolyte and osmolality of spermatid fluid, we suppose that the physiological role of aldosterone in testis and perhaps in spermatozoa could be to regulate these functional parameters. It is not excluded that in situations of hypermineralocorticoidism (hyperaldosteronism or essential hypertension) functional excess of aldosterone could induce ROS generation and related alterations of spermatozoa function.

**109****BEHAVIOUR OF PLASMA BNP CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION DURING ACUTE ADMINISTRATION OF AN ANGIOTENSIN II TYPE I (AT-1)-RECEPTOR BLOCKERS (ARBs)**

Petramala L., Cotesta D., Di Lazzaro F., Iorio M., Serra V.,\*Ursicino N., \*Zepponi E., Letizia C.

Department of Clinical Science, University “La Sapienza” of Rome, \*Laboratory of Clinical Analysis Hospital “S.Camillo de Lellis”, Rieti

Natriuretic type B peptide (BNP) is an hormone of 32 a.a. secreted from the heart in direct proportion to the expansion of the intraventricular volume and to the pressure overload. BNP is synthesized and secreted in the bloodstream in order to control the homeostasis of liquids and electrolytes interacting with renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS).

Aim of the study is to evaluate in a group of 50 consecutive patients with essential hypertension (EH) [Male 18, Female 32, average age  $52.2 \pm 2$  years, body mass index (BMI)  $27.3 \pm 0.6$  kg/m<sup>2</sup>] and in pharmacological wash-out at least from 10 days, the behaviour of plasmatic levels of BNP and the components of RAAS before and after (60 min.) acute administration of Losartan-ARBs, (50 mg x os). The plasma BNP levels have been determined, with an automatic method (Abbot AxSym: quantitative test until 4000 pg/ml with an analytic sensitivity of 15 pg/ml)

In the table are reported the results of the study

	Basal	After 60 min	P value
SBP (mmHg)	149±4	132±5	<0.001
DBP (mmHg)	92±2	82±2	<0.009
HR (bpm)	69±2	64±2	0.08
PRA (ng/ml/h)	1.8±0.3	1.4±0.5	0.08
PAC (pg/ml)	216±34	72±8	<0.001
PC (µg/ml)	16±2	9.5±1	<0.0001
BNP (pg/ml)	30.4±5	24.5±4.3	<0.0001

In conclusion the results of our study show that circulating levels of BNP decrease after acute administration of an ARB, probably for reduction of the synthesis and secretion of BNP due to the partial inactivation of RAAS.

**110****ASPETTI CRITICI NELLA VALUTAZIONE DI LABORATORIO DELLA FUNZIONE TIROIDEA NELLA POPOLAZIONE PEDIATRICA.**

S. Ferraro\*, A. Petri, S. Bellone, R. Baldelli, L. Ciardi\*, G. Antonini\*, G. Tomassini\*, G. Bona, G. Bellomo\*

\*Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Clinica Pediatrica AO Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale, Novara

**Introduzione:** In età evolutiva l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide va incontro a progressiva maturazione e modulazione che si completa con il raggiungimento dell'età adulta. Tale processo di maturazione rende quindi necessario l'uso di valori di riferimento specifici per età e metodo di dosaggio.

**Scopo del lavoro:** Lo scopo di questo studio era di valutare la funzione tiroidea nella popolazione pediatrica sana in funzione dell'età, dello sviluppo puberale relativamente alla metodica utilizzata per i dosaggi di TSH, fT3 ed fT4.

**Materiali e metodi:** La casistica comprendeva 150 bambini sani (4-17 aa, M=84 F=66) prepuberi e puberi. TSH, fT3 e fT4 sono stati dosati in chemiluminescenza (IMMULITE 2000, DPC).

**Risultati:** Sono state osservate discordanze tra i livelli di frazioni libere di ormoni tiroidei e TSH, in particolare per fT3, probabilmente associate ad inadeguatezza dei limiti di riferimento. Le distribuzioni di fT3 ( $p < 0.011$ ;  $W = 0.97$ ), fT4 ( $p < 0.014$ ;  $W = 0.97$ ) e  $\log$  TSH ( $p < 0.02$ ;  $W = 0.98$ ) calcolato con test di Shapiro-Wilk non erano normali, le correlazioni fT4/ $\log$ TSH ( $p = 0.89$ ) e fT4/fT3 ( $p = 0.2$ ) non erano significative. Il rapporto tra i valori dell'adulto e del bambino erano 1.3 per TSH, 1.03 per fT4 e 1.2 per fT3, senza differenze tra prepuberi e puberi. L'assenza di correlazione con gli stadi puberali sembra dimostrare che lo sviluppo puberale non influenza le concentrazioni di TSH, fT3 e fT4. La riduzione dei livelli di fT3 ed fT4, ma non di TSH, in pubertà erano correlate significativamente all'aumento dell'età. I livelli di TSH erano significativamente più alti (1,8-2,2  $\mu$ U/ml) di quelli riportati nell'adulto (1,4-1,6  $\mu$ U/ml). Stesso risultato per fT3 ed fT4, in particolare il 95% dei bambini sani presentavano livelli di fT3 significativamente più alti rispetto all'adulto (4,22-4,48 pg/ml, 3,56-3,8 pg/ml rispettivamente). Dall'osservazione dei casi clinici di bambini eutiroidei e non, si rilevano variazioni importanti di TSH non associate a variazioni di fT3 ed fT4; in particolare i livelli di fT3 sembrerebbero non predittivi della funzionalità tiroidea.

**Discussione:** Questi dati suggeriscono la necessità di adeguare i limiti di riferimento per età in relazione alla progressiva maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide; il dosaggio di TSH, come per l'adulto, resta il test più sensibile nella valutazione della funzionalità tiroidea.

**111****PROCEDURA PER LA STANDARDIZZAZIONE DELL'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE**

Daves M., Cosio G., Scala S., Rizza F.

Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

**Scopi:** nel nostro Laboratorio eseguiamo su prenotazione 3 spermioigrammi/die per problemi legati ad infertilità di coppia, varicocele e patologie infettivo-infiammatorie del tratto genitale. Si è voluto procedere alla standardizzazione della fase preanalitica dell'esame, considerando che tale fase presenta aspetti particolarmente critici per l'efficacia diagnostica del test (1).

**Metodi:** è stato preparato un documento informativo da consegnare al paziente al momento della prenotazione e comunque prima del giorno concordato per l'esame; le istruzioni sono riportate in modo chiaro e conciso, tali da non creare dubbi o difficoltà interpretative: viene indicato a) come raccogliere il campione, b) in che modo ed entro quali tempi deve essere consegnato al Laboratorio, c) i giorni consigliati di astinenza prima di eseguire la raccolta, d) la necessità di segnalare l'eventuale assunzione di farmaci al medico di Laboratorio e e) la necessità di non eseguire la raccolta durante attacchi febbrili (ad eccezione che per ricerche microbiologiche). È stata particolarmente evidenziata nel documento di istruzioni l'importanza del tempo di consegna del campione, spiegando al paziente che se impossibilitato a rispettare tale scadenza è possibile effettuare la raccolta in Laboratorio: a tale scopo è stato adibito un locale con bagno, in modo da fornire la necessaria riservatezza al paziente. Altro fattore importante riguarda il contenitore, che viene fornito direttamente dal Laboratorio.

Le istruzioni sono consegnate al paziente da un medico della nostra UO che oltre a chiarire eventuali dubbi o incomprensioni raccoglie l'anamnesi.

**Risultati:** abbiamo sicuramente ottenuto una maggiore standardizzazione della procedura: i pazienti utilizzano un apposito contenitore fornito dal Laboratorio, vengono rispettati i tempi e le modalità di consegna del campione ed i giorni richiesti di astinenza; ne segue che i campioni giudicati non idonei all'esame sono notevolmente diminuiti. Un paziente ben informato è maggiormente disposto a seguire le indicazioni necessarie per effettuare al meglio lo spermioigramma, test che presenta anche aspetti di natura psicologica che non debbono essere sottovalutati.

**Bibliografia:** 1) Linee guida metodologiche per la standardizzazione delle procedure dell'esame del liquido seminale. Biochimica Clinica 2004; 48: 492-502.

**112****LA MACROPROLATTINA IN LABORATORIO E NELLA PRATICA CLINICA ENDOCRINO-GINECOLOGICA.**

°Gambera A., \*Iacobello C., °Pagnoni S., °Scagliola P., \*Bonardi L., \*Vitale O., \*Gussago A., \*Caimi L., \*Bugari G.

\*Dip. Medicina di Laboratorio, 3° Laboratorio-Ormonologia e Tossicologia, A.O. Spedali Civili, P.le Spedali Civili 1, 25125 Brescia

°Dip. Ginecologia Endocrinologica, A.O. Spedali Civili/Università, P.le Spedali Civili 1, 25125 Brescia

La prolattina (PRL) è un peptide monomero (23 kDa) biologicamente attivo, secreto dalle cellule lattotrope ipofisarie con ritmo circadiano e circamensile (valori più bassi in fase follicolare del ciclo rispetto a quelli in fase luteale). Livelli sierici nel range di 7-26 ng/mL sono indispensabili per l'ovulazione, in sinergia con gli steroidi sessuali e le gonadotropine, e sono permissivi nel mantenimento del corpo luteo. Livelli troppo bassi o troppo alti possono determinare insufficienza del corpo luteo con varie turbe mestruali fino all'anovulazione.

La PRL può presentarsi anche come dimero e/o trimero, variamente glicosilati (big, big-big), o come complesso IgG-PRL (macroprolattina o MPRL) ad alto peso molecolare ~150 kDa. Tale PRL non essendo in grado di attivare il recettore non è biologicamente attiva, ma viene complessivamente dosata, in modo diverso, dai vari metodi immunometrici.

Lo scopo di questo studio è verificare la presenza di MPRL, mediante test di precipitazione con PEG, nelle pazienti che afferiscono all'Ambulatorio di Ginecologia Endocrinologica. Avendo introdotto solo recentemente tale metodica per il perfezionamento della diagnosi in caso di iperprolattinemia, sono state individuate 8 pazienti, inviate in consulenza da altre sedi presso l'Ambulatorio, già in trattamento farmacologico ipoprolattinizzante. Le pazienti si presentavano con oligoamenorrea, ipomenorrea, infertilità, amenorrea secondaria. Dopo sospensione della terapia è stato eseguito il dosaggio della PRL che ne confermava gli elevati livelli circolanti (50.3±10.9 ng/mL; min/max 37-66 ng/mL). Senza terapia in tutte si è assistito al ripristino spontaneo di cicli mestruali regolari ovulatori (progesterone in 23° gg: 14±2 ng/mL). Il valore della PRL dopo test di precipitazione con PEG ha infatti dimostrato la presenza chiaramente significativa di MPRL in 4 pazienti (R<<40%), in una paziente la significatività era borderline (R=54%) ed in 3 un R >60%. La media dei valori di PRL dopo PEG era 22.1±8.8 ng/mL. Al follow-up clinico vi era persistenza di cicli regolari e quindi nessuna di queste pazienti necessitava di terapia specifica per iperprolattinemia.

In conclusione, il metodo di precipitazione con PEG in caso di iperprolattinemia risulta essere un metodo rapido, poco costoso, ma di grande utilità per il clinico, per evitare trattamenti inutili e iatrogenicità.

Suliman AM et al., Clin Chem. 2003 Sep;49(9):1504-9

**113****21- ALFA - IDROSSILASI: CARATTERIZZAZIONE GENETICA E CLINICO-ENDOCRINOLOGICA DI PAZIENTI AFFETTE DAL DEFICIT ENZIMATICO.**

\*Bugari G., °Gambera A., \*Franceschini R., \*Busi D., °Pagnoni S., °Scagliola P., \*Gervasi M., \*Caimi L., \*Iacobello C., \*Di Lorenzo D.

\*Dip. Medicina di Laboratorio, 3° Laboratorio-Ormonologia e Tossicologia, A.O. Spedali Civili, P.le Spedali Civili 1, 25125 Brescia

°Dip. Ginecologia Endocrinologica, A.O. Spedali Civili/Università, P.le Spedali Civili 1, 25125 Brescia

Le Sindromi Adrenogenitali sono patologie determinate da alterazioni degli enzimi della steroidogenesi ovarica e/o surrenalica; si trasmettono con modalità autosomica recessiva (gene CYP21). La più frequente è il deficit di 21- $\alpha$ -Idrossilasi, che complessivamente si riscontra in circa il 5% delle donne iperandrogeniche.

Le manifestazioni cliniche vanno da semplici problemi dermatologici, con riscontro di acne o irsutismo persistenti in età adulta, fino ad anomalie congenite dell'apparato uro-genitale (pseudoermafroditismo) riscontrabili alla nascita, con gravi alterazioni metaboliche (crisi addisoniane) già in età pediatrica.

L'incidenza dei portatori di alterazioni del gene per la 21- $\alpha$ -idrossilasi nella popolazione italiana è 1:70, ed il 50% dei portatori avrebbe e trasmetterebbe mutazioni genetiche dell'enzima. Oggi è possibile mediante una adeguata terapia in utero prevenire nel nascituro le manifestazioni congenite e le alterazioni cliniche maggiori in età pediatrica e adulta.

Lo studio condotto tra il 3° Laboratorio/Biotecnologie ed il Centro di Ginecologia Endocrinologia, ha lo scopo di caratterizzare geneticamente le donne con diagnosi di deficit di 21- $\alpha$ -idrossilasi al fine di garantire una adeguata terapia ed una mirata diagnosi prenatale.

**Diagnosi endocrina:** sulle pazienti con elevati valori di 17-OH progesterone, è stato eseguito il test all'ACTH; e sono state sottoposte all'analisi del gene CYP21 eseguita mediante:PCR, dHPLC e sequenziamento di DNA.

**Metodi:** 17-OHP (RIA-CT, Alifax S.P.A. PD Italia), Androstenedione e Deidroepiandrosterone (RIA-Diagn. Syst. Lab.,Texas); analisi di mutazione per dHPLC (Transgenomic, Nebraska) e sequenziamento diretto (Servizio M. Medical, Roma Italia).

Lo studio del gene CYP21 nelle pazienti selezionate e suddivise a seconda delle manifestazioni cliniche in maggiori (clitoridomegalia, virilizzazione, irsutismo severo, amenorrea) e minori (acne, irsutismo, oligomenorrea, infertilità) ha portato all'identificazione di diverse mutazioni puntiformi, e riarrangiamento del locus 21-OH.

I dati preliminari ottenuti in questo studio confermano la grande eterogeneità delle mutazioni riscontrabili nel gene CYP21 e forniscono nuove possibilità di correlazione con il fenotipi patologici.

Tukel T. et al., J. Clin. End. Met. 88(12):5893-97 2003

**114****DOSAGGIO DELL'ALDOSTERONE PLASMATICO: CONFRONTO TRA METODO IN CHEMILUMINESCENZA E METODO RIA.**

Corgnati A.<sup>#</sup>, Bassi A.<sup>#</sup>, Pizzolo F.\*<sup>\*</sup>, Pavan C.\*<sup>\*</sup>, Guarini P.\*<sup>\*</sup>, Friso S.\*<sup>\*</sup>, Corrocher R.\*<sup>\*</sup>, Olivieri O.\*<sup>\*</sup>, Guidi G.C.<sup>#</sup>.

*#Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università di Verona, 37134-Verona, Italia; \*Divisione di Medicina Interna, Dipartimento di Medicina Clinica e sperimentale, Università di Verona, 37134-Verona, Italia.*

**Introduzione.** Negli ultimi anni la prevalenza d'ipertensione da iperaldosteronismo è enormemente aumentata, attestandosi intorno al 15-18%. Di recente è stato proposto l'uso di un nuovo metodo di dosaggio dell'aldosterone in chemiluminescenza. Abbiamo comparato tale metodo col radioimmunometrico (RIA) tradizionale, considerato generalmente il sistema di riferimento. **Materiali e Metodi.** Su 180 campioni pervenuti al nostro laboratorio sono state utilizzate una metodica RIA ed una in chemiluminescenza per dosaggio dell'aldosterone. Su 70 campioni è stato effettuato il confronto anche con un altro metodo RIA. Sono inoltre stati analizzati 18 campioni prima e dopo test di inibizione eseguito per confermare la diagnosi di iperaldosteronismo (11 test con soluzione salina, 7 con florinef). **Risultati.** Buona era la correlazione dell'aldosteronemia ottenuta utilizzando i due kit RIA (coefficiente di Pearson  $r=0.94$ ). La correlazione tra metodica RIA e chemiluminescenza risultava invece inferiore a 0.9 ( $r=0.853$ ), ed era più bassa per valori d'aldosterone  $<100$  pg/ml rispetto a valori  $>100$  pg/ml ( $r=0.31$  e  $0.854$  rispettivamente). I dosaggi dell'aldosterone in chemiluminescenza risultavano significativamente inferiori rispetto a quelli ottenuti in RIA (media  $83.81 \pm 68.89$  versus  $143.17 \pm 87.93$  pg/ml rispettivamente). I valori di aldosterone dosati in RIA prima del test di inibizione erano  $>150$  pg/ml in tutti i 18 campioni, mentre lo erano solo in 4 campioni dosati in chemiluminescenza. Sette su 18 test risultavano positivi per la diagnosi d'iperaldosteronismo in RIA (aldosterone  $<50$  pg/ml dopo test d'inibizione), solo uno risultava positivo in chemiluminescenza. **Conclusioni.** I valori d'aldosterone ottenuti in chemiluminescenza appaiono sottostimati rispetto a quelli ottenuti in RIA. Come conseguenza, non possono essere utilizzati gli stessi valori soglia per la diagnosi d'iperaldosteronismo primitivo. La correlazione tra i due metodi non risulta soddisfacente per valori d'aldosterone  $< 100$  pg/ml.

**115****HETEROPHILE ANTIBODY INTERFERENCES IN SERUM CALCITONIN ASSAYS**

Grasso L., Luchetti F., Elisei R., Sculli M., Castagna M., Viccica' G., Pasqualetti F., Fragomeni F., Pinchera A.

Department of Endocrinology. University of Pisa. Italy

Elevated serum value of calcitonin (CT) and its increase after pentagastrin stimulation test represent the most important tool for the diagnosis of medullary thyroid carcinoma.

Heterophile antibody present in the serum of patients can interfere in hormonal CT assay, depending on the employed method, and produce a "false" elevated value. In the present study twenty subjects with no clinical evidence of medullary thyroid carcinoma or other malignancies with elevated basal serum calcitonin and no response to pentagastrin test has been evaluated.

Three commercial kits have been used: A (Schering S.A.; Irma hCT) ; B (BioSource Europe S.A.; CT-US Irma) and C( Scantibodies Laboratory Inc.Irma CT) All the kit were calibrated with the Second International Standard 89/620.

Using method A basal serum CT concentrations were elevated ( $18-72$  ng/ml ) and 3-5 minutes peak after pentagastrin administration were unchanged.

Using method B basal serum CT were ( $16-62$  ng/ml) and 3-5 minutes peak after pentagastrin test were unchanged.

Using method C serum CT concentration were undetectable in all cases.

Looking for difference among the three methods we found that the calcitonin antibodies used in method A and B were mouse monoclonal antibodies while method C used goat polyclonal antibody .

In order to explain the discrepant results obtained with the three kits, the possible presence in serum of heterophile antimouse antibody has been evaluated by the addition at samples of normal mouse serum and subsequent CT determination

The basal and pentagastrin stimulated serum calcitonin concentration were undetectable in all samples using the three methods indicating that "false" elevated serum calcitonin concentration was due to the presence of heterophile antibody.

Thus, caution should be used in the interpretation of elevated serum calcitonin values when the antimouse CT antibodies are employed in commercial kits.

Ref. Kricka LJ 1999 Human anti-animal antibody interference in immunological assays. Clin Chem 45:942-956.

**116****HGF IS A MOTOGENIC FACTOR FOR NEURAL PRECURSORS AND EARLY STAGES OF MOTONEURON DIFFERENTIATION.**

Cacci E., Soldati C., Poiana G., Augusti-Tocco G., Biagioni S.  
Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo,  
Università "La Sapienza", piazzale A. Moro 5  
00185 Roma

Hepatocyte growth factor (HGF) is a pleiotropic factor which activates cell proliferation, differentiation and migration of various cell types. Its action is mediated by a receptor, Met, endowed with tyrosine kinase activity, which activates a complex signalling cascade and mediates the diverse cell responses. Although HGF action has been first demonstrated on epithelial cells, HGF and Met receptor expression have also been described in the developing and adult mammalian brain. In the developing central nervous system HGF and Met expression areas are coincident with the migratory paths of precursor cells. We have investigated the action of HGF on neural precursors, using a stable cell line ST14A, which has been derived by immortalization of rat striatum primordium cells (E14) following retroviral transduction of the temperature-sensitive tsA58/U19 allele of SV40 large T antigen. We reported that ST14A cells express Met receptors, which is activated by HGF addition to the culture medium. The interaction between Met and HGF/SF in ST14A cells triggers a signalling cascade that induces modification in cell behaviour, with a decrease in cell-cell interactions and increase of cell motility. No effect on cell proliferation was observed. The use of specific inhibitors of MAP/ERK kinases and PI3 kinase has also shown that the latter is responsible for the activation of ST14A motogenic response.

We have also shown that HGF activates in ST14A cells reorganization of actin cytoskeleton and delocalization of the junctional component  $\beta$ -Catenin; these effects are not abolished by the PI3-kinase inhibitor (LY294002). Western blot analysis also indicates that, upon mobilization from the adhesion complex,  $\beta$ -Catenin is directed to proteasome for degradation.

We also investigated the effects of HGF/SF on primary spinal cord cell culture and showed a possible motogenic effect also on spinal cord neurons.

The data reported support a role of HGF as a motogenic factor in early steps of neurogenesis.

Reference:

Cacci E., Salani M., Anastasi S., Perroteau I., Poiana G., Biagioni S., Augusti-Tocco G. (2003) "Hepatocyte Growth Factor stimulates cell motility in cultures of the striatal progenitor cells ST14A" *J. Neurosci. Res.*, 74: 760-768.

**117****PLASMA BNP LEVELS IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION**

Cotesta D., Petramala L., Di Lazzaro F., Iorio M., Serra V., \*Ursicino N., \*Zepponi E., Letizia C.  
Department of Clinical Science, University "La Sapienza" of Rome, \*Laboratory of Clinical Analysis Hospital "S.Camillo de Lellis", Rieti

Natriuretic type B peptide (BNP) is an hormone of 32 a.a. that has vascular, renal and cerebral receptors and it is secreted from left ventricular myocyte in response to the extension of fibromiocardial and increase renal sodium excretion.

Aim of the study was to evaluate the behaviour of circulating levels of BNP, using an automatic method (Abbot AxSym: quantitative test until 4000 pg/ml with an analytic sensitivity of 15 pg/ml), in a group of 118 patients with essential hypertension [EH 57 M, 61 F, average age 51.1  $\pm$ 1.2 years, body mass index (BMI) 28 $\pm$ 0.5 kg/m<sup>2</sup>] compared to 43 healthy subject (21 M, 22 F, average age 47.3  $\pm$ 0.6 years, BMI 24 $\pm$ 0.3 kg/m<sup>2</sup>). Moreover we have evaluated the variations of BNP in the IE patients sharing them in subgroups in relation to the duration of the hypertensive state [EH-neodiagnosis (EH-neo, 50 M 23, F 27, average age 47.8  $\pm$ 1 years, BMI 27.8 $\pm$ 0.4 kg/m<sup>2</sup>), EH-old diagnosis (EH-old 68 M 34, F 34 average age 53.2  $\pm$ 1.8 years, BMI 28.6 $\pm$ 0.6 kg/m<sup>2</sup>)] and the presence of left ventricular hypertrophy (LVH) evaluated with ecocardiography [EH with LVH (EH-LVH+ n 22 M 12, F 10 average age 50.4  $\pm$ 1.9 years, BMI 28.3 $\pm$ 0.7 kg/m<sup>2</sup>) and EH without LVH (EH-LVH- n 96 M 45, F 51 average age 54.2  $\pm$ 2 years, BMI 28.7 $\pm$ 0.9 kg/m<sup>2</sup>)].

The results of our study show that the plasma BNP levels were significantly higher ( $p < 0.001$ ) in EH-old (36.3 $\pm$ 5.6 pg/ml) than those in HS (27 $\pm$ 1.4 pg/ml) and in EH-neo (17.2 $\pm$ 3.7 pg/ml). In addition, in IE patients with LVH (52  $\pm$ 11.6 pg/ml) the plasma BNP levels were significantly higher ( $p < 0.001$ ) than those in patients without LVH (21 $\pm$ 3.6 pg/ml).

The correlation study revealed that in IE patients there is a significant correlation between plasma BNP levels, and left atrial diameter ( $r = 0.39$ ;  $p < 0.005$ ) and a significant correlation between plasma BNP and plasma aldosterone concentrations ( $r = 0.2$ ;  $p < 0.05$ ).

In conclusion our results show an increase of plasma BNP levels in patients with EH, in particular in those with a prolonged status of hypertensive and signs of heart remodelling.

**118****EXPRESSION OF P22<sup>phox</sup> AND PAI-1 OXIDATIVE STRESS MARKERS IN HUMAN SPERMATOZOA**

\* Pellati D.; \* Bertoldo A.; ^ Pagnin E.; \* Fiore C.; \* Armanini D.

\*Department of Medical and Surgical Sciences – Endocrinology, via Ospedale 105, 35129 Padova and Department of Clinical and Experimental Medicine, via Giustiniani 2, 35128 Padova - University of Padova.

Male infertility is recently becoming a social problem. The alteration of sperm function is due to various factors and in particular to the oxidative stress. A reactive oxygen species (ROS) over production, actually, can alter the spermatid fluid composition and the sperm motility. We have demonstrated an induction of oxidative stress marker expression, caused by the incubation with aldosterone, which was blocked by addition of canrenone, an aldosterone receptor blocker. The aim of this study was to evaluate the expression of p22<sup>phox</sup> e PAI-1 and the involvement of aldosterone in the over expression of these genes.

In sperm samples obtained from 20 men, aged from 25 to 35 years, we evaluated the expression of p22<sup>phox</sup> and PAI-1 using Western-blot analysis.

Total protein extract was obtained after cells lysis with a specific buffer, and it was separated by SDS-PAGE. Primary monoclonal antibodies anti-p22<sup>phox</sup> and anti PAI-1 were used. The secondary antibodies were HRP-conjugated, and immunoreactive proteins were visualized with chemiluminescence using SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate.

The p22<sup>phox</sup> and PAI-1 protein expression were quantified by a densitometric semiquantitative analysis using NIH image analyzer software.

In this work we saw that PAI-1 and p22<sup>phox</sup>, immediately after the separation, were expressed only in 40% of the normal volunteers subjects; moreover, the incubation of spermatozoa with aldosterone didn't modify the expression of these markers.

In conclusion a correlation between functional parameters related to spermatozoa and the different expression of oxidative stress markers should be evaluated in a more consistent number of patients.

**119****STUDIO DI CORRELAZIONE TRA DUE SISTEMI ANALITICI PER IL 17 $\beta$ ESTRADIOLO E IL CA19.9**

Falciani C.; Palla A.; Botta N.; Setzu G.; Simonini N.; Giordano M.; La Gioia A.

U.O. Patologia Clinica Azienda USL6- Livorno

La determinazione ematica di particolari analiti, quali ormoni steroidei e marcatori tumorali, ha presentato sin dall'inizio rilevanti problematiche di varia natura rendendo difficile il conseguimento di una soddisfacente standardizzazione metodologica. L'introduzione e il conseguente sviluppo di tecniche immunometriche completamente automatizzate hanno permesso di raggiungere ottimi risultati in termini di affidabilità analitica. Scopo di questo studio è stato quello di valutare le performances analitiche, in termini di correlazione, di alcuni sistemi immunometrici presenti nel nostro laboratorio. Avendo avuto l'opportunità di avere presso il Laboratorio la strumentazione UniCel DxI 800 Access (Beckman) per un limitato periodo di prova, si è pensato di eseguire dosaggi in doppio utilizzando sistemi analitici di routine: Architect (Abbott) e Immulite 2000 (Medical System). Per questo scopo sono stati scelti due analiti, la cui determinazione presenta aspetti di criticità dal punto di vista analitico: il 17 $\beta$ estradiolo e il Ca 19.9. Campioni di siero sono stati analizzati random su Architect e UniCel DxI per quanto riguarda il dosaggio del Ca 19.9 (N=86), e su Immulite 2000 e UniCel DxI per il dosaggio del 17 $\beta$ estradiolo (N=44). **Risultati:** Per il Ca 19.9 è stato ottenuto un valore di  $r^2 = 0,70$  (range di concentrazione: 1,6-2876 U/mL). Eliminando i valori più elevati e considerando quindi un range di concentrazione di 1,6-172,5 U/mL (N=79) è stato ottenuto un  $r^2 = 0,85$ , notevolmente migliore. Per il 17 $\beta$ estradiolo il range di concentrazione osservato (13 – 267 pg/mL) ha dato un valore di  $r^2 = 0,79$ . **Conclusione:** i risultati ottenuti dai due sistemi analitici considerati hanno dato correlazioni soddisfacenti per il 17 $\beta$ estradiolo e per il Ca 19.9 limitatamente ad un range di valori medio-bassi. Per quest'ultimo analita è stato osservato che aumentando la concentrazione (valori >500 U/mL) viene a mancare la correlazione tra dati, in tal caso si prospettano problematiche particolari che meritano un approfondimento più dettagliato ed una casistica molto più numerosa. Nel complesso, tuttavia, si può sostenere una certa uniformità del dato ottenuto e un buon livello di qualità e di affidabilità analitica da parte dei sistemi considerati.

**120****STUDIO DELLA FUNZIONE TIROIDEA DURANTE LO SVILUPPO PUBERALE**

Radicioni A.F.<sup>1</sup>, Anzuini A.<sup>1</sup>, De Marco E.<sup>1</sup>, Quagliozzi G.<sup>1</sup>, Bellati P.<sup>2</sup>, Lenzi A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of Endocrinology, Department of Medical Pathophysiology, University of Rome "La Sapienza", Rome, Italy <sup>2</sup>Abbott Diagnostic Division, Italy

Lo sviluppo puberale si caratterizza per l'incremento della velocità di crescita, della maturazione gonadica con l'acquisizione dei caratteri sessuali secondari e della capacità riproduttiva, le modificazioni della composizione corporea fino al rapporto massa magra/massa grassa caratteristico, per i due sessi, dell'età adulta. Queste evidenze cliniche sono determinate da parallele significative modificazioni dei livelli ormonali ed in particolare dell'asse GH-IGF1, Ipotalamo-ipofisi-gonade (HPG) e Ipotalamo-ipofisi-surrene. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la funzione tiroidea (TSH, FT3, FT4) durante la normale maturazione puberale. Il disegno dello studio prevede l'arruolamento di 100 soggetti normali (range età: 7.3 – 16.6 anni) suddivisi in base allo stadio puberale secondo Tanner in 5 gruppi di 20. Tutti i soggetti sono giunti alla nostra osservazione per controllo dello sviluppo puberale mostrando una buona corrispondenza tra stadio puberale ed età cronologica. Inoltre, come controllo, sono stati studiati 30 soggetti adulti normali (A)(range età: 30.2 – 42.7 anni). A tutti i soggetti ed ai loro genitori è stato richiesto un consenso informato scritto.

TSH, FT3 ed FT4 sono stati valutati nel siero mediante metodica in immunochemiluminescenza CMIA (Chemiluminescent microparticle immunoassay) (Architect System, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), con limite di sensibilità analitica di 0.0025  $\mu$ UI/mL (TSH), 1.0 pg/mL (FT3) e 0.4 ng/dL (FT4). Coefficiente di variazione intra- e inter-assay rispettivamente 1.1 e 1.6% a 2.46  $\mu$ UI/mL (TSH), 1.8 e 2.3 % a 2.12 pg/mL (FT3), 2.2e 3.1% a 1.24 ng/dL (FT4), per il nostro laboratorio. Il confronto tra le medie delle 3 variabili per ogni gruppo considerato, mediante il test ANOVA, ha permesso di dimostrare una differenza statisticamente significativa per l'FT3 (P=0.002) e l'FT4 (P=0.03). Non significativa è risultata la differenza delle medie del TSH. In particolare, l'analisi dei confronti multipli ha evidenziato differenze significative.

1. FT3: G1 vs A (P=0.044), G2 vs A (P=0.05), G3 vs A (P=0.004), G4 vs A (P=0.001), G5 vs A (P=0.007).

2. FT4: G3 vs A (P=0.04), G4 vs A (P=0.05).

Questi dati dimostrano che i valori degli ormoni tiroidei in età pediatrica sono significativamente diversi da quelli dell'adulto e devono essere attentamente valutati per l'importante ruolo che la tiroide ha durante la maturazione puberale (Harvey et al., Mol. Genet. Metab. 2002, 75:17-30).

**121****DETERMINAZIONE DELLA BUPRENORFINA URINARIA SU AU400 OLYMPUS E PROPOSTA DI RANGE DI RIFERIMENTO IN CORSO DI TERAPIA**

Latte A.<sup>1</sup>, Cangiano G.<sup>1</sup>, Garofano R.<sup>2</sup>, Russo M.<sup>1</sup>, Forte F.<sup>1</sup>, Graziano G.<sup>1</sup>, D'Amora M.<sup>3</sup>, Risitano A.<sup>1</sup>

ASL NA 1: <sup>1</sup>Laboratorio Patologia Clinica P.O. Pellegrini; <sup>2</sup>U.O. SERT – Distretto 47; <sup>3</sup>Laboratorio Patologia Clinica P.O. Incurabili.

La quantificazione urinaria della buprenorfina, corretta con il dosaggio della creatinuria, rappresenta un valido strumento per la verifica terapeutica dell'assunzione sub-linguale del farmaco effettuato presso i Servizi Tossicodipendenze (SERT).

Col presente lavoro si propone di valutare l'immunodosaggio enzimatico omogeneo CEDIA, effettuato sull'analizzatore di chimica clinica AU 400 della ditta Olympus, al fine di determinare concentrazioni di farmaco urinario utili sia allo screening di campioni a valenza medico-legale che per i pazienti SERT sottoposti a terapia con Subutex.

Il dosaggio della buprenorfina viene effettuato con un'unica calibrazione a 5 punti (poligonale – 5AB) e precisamente 0, 5, 20, 50 e 75 ng/mL.

Ad 87  $\mu$ L di reagente R1 (anticorpi monoclonali murini anti-buprenorfina, sali tampone ed accettore enzimatico) vengono miscelati 7  $\mu$ L di urina. Dopo opportuna incubazione (circa 10 cicli macchina) l'analizzatore biochimico inserirà il reagente R2 (donatore enzimatico coniugato con buprenorfina, substrato, sali tampone). La lettura in cinetica verrà effettuato tra i cicli 24 e 27 alla lunghezza d'onda primaria di 570 nm ed a quella secondaria di 660 nm.

Nell'intervallo analitico compreso tra 5 (valore di cut-off) e 75 ng/mL di buprenorfina viene evidenziato un profilo di imprecisione mostrante un CV% < 5%. Le prove di recupero nel range 1 – 75 ng/mL mostrano coefficienti di variazione compresi tra 95,0 e 117,4% (recupero medio del 98,2%). Le prove di precisione nella serie e tra le serie, mostrano CV% inferiori al 5%. Uno studio iniziale effettuato su 17 pazienti sottoposti a diverso dosaggio di buprenorfina e precisamente a 4, 8, 16 e 24 mg, ha messo in evidenza i seguenti intervalli di riferimento:

dose (mg)	buprenorfina (ng/mL) / creatinina (mg/mL)
4	44 - 155
8	110 - 311
16	432 - 690
24	650 - 920

Tale metodo omogeneo è estremamente rapido ed indicativo per la terapia. Rispetto ai metodi cromatografici non riesce però a discriminare eventuali adulterazioni. Le elevate concentrazioni sopra citate vengono rilevate utilizzando la metodica urinaria in quanto in grado di effettuare una prediluizione automatica del campione di 1:20 con acqua distillata. Cangiano G., D'Amora M., Manera B. et Al. Monitoraggio farmacologico della buprenorfina a scopo terapeutico. Biochim. Clin., 2002, vol. 26, n.5: 419-423.

## 122

CDT IN ELETTROFORESI CAPILLARE:  
CONFRONTO TRA METODICHE

Palla A.; Salotti V.\*; Simonini R.; La Gioia A.; Di Pietro N.\*; Palombo F.\*

U.O. Patologia Clinica, Azienda USL 6 – Livorno

\*GeneDia srl – Lammari (Lucca)

La transferrina desialata (CDT), marker biochimico di abuso alcolico, è comunemente utilizzato negli accertamenti diagnostici in ambito medico-legale. Tra le varie tecniche analitiche impiegate nella determinazione della CDT vi è l'elettroforesi capillare (CE) che permette la separazione delle varie isoforme della transferrina (Tf). Scopo del lavoro è stato quello di confrontare i risultati di CDT ottenuti con due metodiche in CE. **Materiali e metodi:** è stato analizzato un campione di 88 soggetti, prevalentemente maschi, provenienti dal Servizio di Medicina Legale. La CDT è stata eseguita in CE con due sistemi analitici diversi: 1. **SEBIA (SB):** sistema automatico Capillarys (Sebia), Capillarys CDT kit (Sebia); 2. **GENEDIA (GD):** strumentazione P/ACE 5000 e P/ACE MDQ (Beckman Coulter), P/ACE CDT kit (GeneDia). **Calcolo della CDT:** i risultati di CDT sono stati espressi come % delle isoforme CDT (essenzialmente 2-sialoTf) rispetto a 3-sialo-Tf + 4/5-sialoTf (metodica SB) e come % di 2-sialo-Tf rispetto a 4-sialoTf (metodica GD). In aggiunta sono stati raccolti i valori di CDT% ottenuti con la metodica GD ed espressi con il metodo di calcolo SB (GDm). **Analisi statistica:** i risultati ottenuti sono stati sottoposti al calcolo di media, mediana ed allo studio di correlazione mediante regressione lineare. **Risultati:** la positività dei dati analitici è stata valutata secondo i cut-off indicati dalla Ditte produttrici dei kit: 1,3% per SB e 2,3% per GD. Per GDm è stato usato il cut-off di 1,3%. **Confronto tra SB/GD:** le due metodiche sono risultate statisticamente correlate con una media GD più elevata di quella SB. Sono stati riscontrati 4 casi discordi (positivi GD/negativi SB). **Confronto SB/GDm:** anche in questo caso la media GDm è risultata più alta di quella SB. Sono stati osservati 28 casi discordi (positivi GDm/negativi SB). Risultato pressoché identico è stato ottenuto con il confronto GD/GDm (25 positivi GDm/negativi GD). **Conclusioni:** il confronto dei risultati di CDT ottenuti con le due metodiche ha evidenziato: 1. l'impossibilità di standardizzazione metodologica in termini di metodo di calcolo e di cut-off; 2. l'adeguatezza della tecnica CE nello screening della CDT; 3. la necessità di impiego della HPLC come metodo di conferma; 4. la valutazione da parte della metodica GD di un range di criticità più ampio intorno ai valori borderline. **Bibliografia:** Stibler H. Clin. Chem. 1991;37:2029-2037).

## 123

## CONFRONTO TRA UN METODO HPLC-ESI-MS/MS E UNO IMMUNOENZIMATICO (MEIA) PER IL DOSAGGIO DEL SIROLIMUS IN PAZIENTI PEDIATRICI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO RENALE

<sup>1</sup>Molinari M., <sup>1</sup>Carazzone C., <sup>1</sup>Rebagliati G., <sup>2</sup>Carasi C., <sup>3</sup>Dello Strologo L., <sup>4</sup>Amore A., <sup>5</sup>Ginevri F.

<sup>1</sup>Dip. Farmacologia, IRCCS-Policlinico S.Matteo (Pavia); <sup>2</sup>Div. Dialisi e Trapianto, Clinica Pediatrica, Az. Ospedaliera (Padova); <sup>3</sup>Div. Nefrologia e Dialisi, Osp. Bambino Gesù (Roma); <sup>4</sup>Div. Nefrologia e Trapianti, Osp. Infantile Regina Margherita (Torino); <sup>5</sup>Div. Nefrologia e Trapianti, Istituto Giannina Gaslini (Genova).

Nell'ambito della variabilità farmacocinetica del sirolimus (Sir), l'età costituisce un fattore di notevole interesse. E' indubbio che questi pazienti possano enormemente beneficiare di una terapia immunosoppressiva in grado di ottimizzare la concentrazione efficace. I metodi disponibili per il TDM comprendono metodi cromatografici ed immunoenzimatici.

Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare la correlazione tra un metodo HPLC-MS/MS validato ed uno immunoenzimatico (MEIA) applicato allo strumento IMx® (Abbott), per la determinazione del Sir in un gruppo di pazienti pediatrici.

90 campioni ematici provenienti da 5 pazienti pediatrici di età compresa tra 6 e 16 anni sottoposti a trapianto renale, sono stati contemporaneamente analizzati con le due suddette metodiche. Tali campioni erano parte di profili cinetici rappresentativi di concentrazioni ematiche allo steady-state.

Il Sir era introdotto in terapia come agente di "rescue" dopo un periodo mediano di 5,9 anni (range: 0,6-8,6) dal trapianto, alla dose mediana di 3000 mcg/die (range: 2000-4000 mcg/die). La media±DS delle concentrazioni "trough" di Sir determinate in HPLC-MS e MEIA erano di 4,6±1,6 ng/mL e 5,7±1,7 ng/mL, rispettivamente.

L'analisi di regressione lineare effettuata sui 90 campioni indicava la seguente correlazione: MEIA = 1,2 x (HPLC-MS/MS) + 1,3 ng/mL (r<sup>2</sup>=0,8). Il limite di concordanza tra i due metodi è stato valutato tramite il metodo di Bland-Altman che ha evidenziato una sovrastima del metodo MEIA vs HPLC-MS/MS con un bias% medio del +28,1% (-27,3%/+101,6%). La differenza media assoluta tra i due metodi era di 3,2±3,0 ng/mL (range = -1,8/+12,3 ng/mL) per un range di concentrazioni misurato in HPLC-MS/MS di 2,3-20,6 ng/mL.

Considerando la differente velocità di metabolizzazione della popolazione pediatrica rispetto all'adulto, tale sovrastima deve essere valutata alla luce della possibile reattività crociata dell'anticorpo monoclonale MEIA con i metaboliti circolanti del Sir. La scarsità di dati farmacocinetici disponibili nei bambini è di stimolo per l'approfondimento del valore clinico di tali dati.

**Bibliografia:**

I. Schubert M., Venkataramanan R., Holt D.W., Shaw L.M., McGhee W., Reyes J, Webber S. and Sindhi R. "Pharmacokinetics of sirolimus and tacrolimus in pediatric transplant patients". Am J Transplant 2004, 4:767-733

**124****SMART DRUG: PROBLEMA EMERGENTE NELLA TOSSICOLOGIA ANALITICA**

Pichini S., Pellegrini M., Marchei E., Pacifici R.,  
Dipartimento del Farmaco Istituto Superiore di Sanità,  
Roma, Italy.

Con il termine *Smart drugs* si intende una serie di composti costituiti da nutrienti, bevande, vitamine, estratti vegetali derivati da diverse piante con supposto effetto psicotropo.

Le smart drugs possono trovarsi sotto forma di bevande energetiche o alcoliche, tisane rilassanti, erbe fumabili, prodotti per dimagrire e integratori alimentari. Uno dei principali problemi in tossicologia analitica è, che per molte di queste droghe non sono disponibili standard di riferimento dei principi attivi e metodiche di analisi di questi ultimi.

La strategia analitica adottata dal nostro laboratorio, che dall'anno 2003 ha analizzato più di 150 prodotti, è stata la seguente: su tutti si è eseguita un'estrazione a diverso pH (basico, neutro ed acido) per la ricerca di principi farmacologicamente attivi (incluse le sostanze di cui alla tabella I del DPR 309/90); messa a punto di metodologie di estrazione e d'analisi dei principi attivi laddove individuati; verifica della corrispondenza tra etichetta e risultati analitici ed individuazione dei principi attivi in matrici biologiche di consumatori. Una delle "smart drugs" più diffuse e più note è la *Salvia divinorum*. Pianta originaria del Messico, contiene Salvinorina A, un potente allucinogeno. Il contenuto medio di principio attivo determinato (1) nelle foglie è di circa 0.58 mg (pari a 7.7 mg/g), la quantità trovata nei campioni biologici analizzati era di 11-25 ng/ml nel caso della saliva e 2.4-10.9 ng/ml nell'urina. In seguito al parere favorevole dell'Istituto Superiore di Sanità, la Salvinorina A è stata inserita nella tabella I del DPR 309/90. Nell'analisi dei semi di *Argyrea nervosa* (nota anche come Hawaiian baby woodrose) e l'*Ipomea violacea* (nota come Morning glory) il contenuto medio del loro principio attivo, l'ammide dell'acido lisergico (LSA), è risultato dello 0.14% e dello 0.02%, rispettivamente. La LSA è presente nella tabella I del DPR 309/90. Per le bevande energetiche e gli integratori alimentari costituiti da piante quali *Guaranà*, *Cola nitida*, *Ilex paraguayensis*, *Yerba mate*, il cui principale principio attivo è la caffeina, le nostre analisi hanno confermato le concentrazioni dichiarate in etichetta.

Il principio attivo delle foglie di Ma Huang (*Ephedra*) assunte principalmente come rimedio "naturale" per perdere peso e come supplemento energetico è l'efedrina, sostanza inserita nella lista dei farmaci dopanti della legge 376/2000. Il contenuto medio determinato nei prodotti analizzati era di 25-30 mg/g.

(1) Pichini S. *et al.* Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; **19**: 1649-1656

**125****MATRICI BIOLOGICHE NON CONVENZIONALI IN FARMACOTOSSICOLOGIA NEONATALE E PEDIATRICA**

Pellegrini M., Marchei E., Pichini S., Pacifici R.,  
Zuccaro P.

Dipartimento del Farmaco Istituto Superiore di Sanità,  
Roma, Italy;

L'utilizzo delle matrici biologiche non convenzionali come placenta, sangue di cordone, meconio e capelli neonatali ha come obiettivo fondamentale quello di stabilire oggettivamente l'esposizione fetale acuta e/o cronica a xenobiotici. Analogamente, sangue, urine, capelli e denti di bambini sono matrici che danno informazioni su intossicazione acute ed esposizione cronica ad eventuali sostanze tossiche. Sono state messe a punto metodologie per l'analisi di: oppiacei, anfetamine, cocaina ed arecolina (alcaloide dell'Areca Nut) in meconio di neonati utilizzando cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa al fine di individuare l'esposizione intrauterina a tali sostanze d'abuso; di alprazolam e del suo principale metabolita alfa-idrossialprazolam in meconio, sangue di cordone, placenta e capelli di neonati di madri consumatrici di tali sostanza che presentavano alla nascita stress respiratorio e sindrome di astinenza neonatale utilizzando gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa; di anfetamine e cocaina in urina e capelli di bambini con gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa per determinare queste sostanze in bambini ricoverati d'urgenza per sospetta intossicazione acuta od esposizione cronica a tali sostanze d'abuso; di nicotina, oppiacei e cocaina in denti da latte per verificare sia l'esposizione pre che post natale al fumo di tabacco e alle principali sostanze d'abuso. L'analisi di sostanze d'abuso nel meconio ha mostrato una prevalenza di esposizione ad oppiacei, cocaina ed alle due sostanze contemporaneamente, pari a 8.7%, 4.4% e 2.2% rispettivamente in una coorte di 1151 neonati, le cui madri dichiaravano consumo di sostanze d'abuso in meno della metà dei casi trovati positivi. L'alprazolam ed il suo principale metabolita alfa-idrossialprazolam sono stati identificati sia nel sangue di cordone sia nei capelli di neonato di madre consumatrice di tale farmaci con concentrazioni pari a 25.1 ng/ml nel caso del cordone e 26.1 ng/g nel caso dei capelli, con tacce del farmaco parente in meconio e placenta, confermando l'esposizione prenatale a tale sostanza. Le metodologie d'analisi di anfetamine e cocaina in capelli di bambini hanno consentito la risoluzione di casi di intossicazione acuta e la scoperta di esposizione cronica a cocaina in due lattanti. L'identificazione di nicotina, cotonina, metabolici dell'eroina, cocaina e benzoilecgonina in denti da latte conferma l'identificazione di una nuova matrice biologica non invasiva che presenta una finestra di tempo d'esposizione ben più ampia di quella offerta dai capelli.

Pichini et al. J. Chromat B. 2003; 794: 281-292

## 126

## HEXAFLUOROISOPROPANOL AS BIOMARKER OF SEVOFLURANE OCCUPATIONAL EXPOSURE

Bonazzina R.°, Martini A.\*

\*Clinical Biochemistry Laboratory,

°Occupational Medicine Service,

A.O." Ospedale Civile di Legnano" – 20025 (MI)

Sevoflurane (SF), is an alogenated anaesthetic gas chemically related to a polyfluorinated ether. Urinary levels of SF and its metabolite, Hexafluoroisopropanol (HFIP), measured by GC/MS, are currently used markers for biological monitoring of the occupational exposure. At the present, for the last marker, there isn't a well established BEI. Proposed BEI for HFIP is 168 µg/L and 488 µg/L for environmental levels of SF respectively of 0,5 and 2 ppm (1).

Aim of this study was to reports our data concerning the validity of the HFIP urinary levels as biomarker in the biological monitoring of SF occupational exposure.

Materials and methods: we have measured SF and HFIP levels in 167 urine samples (56male and 111 female) from surgical staff (nurses, surgeons, anaesthetists) of 18 operating theaters.. The urine samples (10 mL) were collected at the end of operating work, after a minimum exposure of 4 hour, and store immediately at -20°C until analysis. Analysis were performed in agreement to the methods of Barbic et al. (2), with slight modifications.

Results: the workers were divided in three group (0,1,2), in agreement to the days of SF exposure.

In the group 0 (individuals exposed only the day of the collection or more than 2 days before) the mean value for the SF was <1.0 µg/L (LOQ) and for the HFIP was 111 µg/L (SD 58 µg/L). In the group 1 (individuals exposed the day of the collection and one day before) the mean value for the SF was <1.0 µg/L (LOQ) and for the HFIP was 289 µg/L (SD 198 µg/L). In the group 2 (individuals exposed the day of collection and also the two days before) the mean value observed for SF was < 1.0 µg/L (LOQ) and the mean value for HFIP was 175 µg/L (SD 144 µg/L).

Conclusion: our data are in agreement with previous report (2) wich emphasized that urinary HFIP levels better reflect the exposure to environmental SF respect to urinary SF. Therefore, biological monitoring should be performed on the bases of HFIP levels and, obviously, airborne SF concentrations.

References:

- (1) Imbriani M., Zadra P. et al. Med. Lav. (2001), vol. 92, (3),173-180.
- (2) Barbic F., Bagnati M. et al. G.It.Med.Lav.Erg. (2003), vol.25,(3), Supplemento 3.

## 127

## HPLC VS KIMS (COBAS INTEGRA) COCAINE DETERMINATION.

Tocchini M.; Pigini P.; Coppa G.; Gambini A.M.; Martini C.

Laboratorio Analisi Ospedali Riuniti Ancona.

A simple, but sensitive and specific, high-performance liquid chromatographic assay for cocaine with direct fluorimetric detection, particularly intended for the routine analysis urine samples, is described. Benzoyllecgonine, eluting before cocaine in a completely resolved peak, is also detectable. The identification of benzoyllecgonine and cocaine was obtained comparing the peak retention times.

A mixed-mode solid phase extraction (SPE) method for the isolation of cocaine and benzoyllecgonine from urine was developed, followed by high-performance liquid chromatography/fluorimetric detection. SPE is highly effective and led to significant decreases in the analytical interferences. Cartridges were preconditioned with methanol and phosphate buffer pH6. The sample, after phosphate buffer treatment, was applied. In the wash step was used water, hydrochloric acid and methanol. Cocaine and benzoyllecgonine were eluted with dichloromethane / isopropanol / ammonium hydroxide (78/28/2). After evaporation the volume was bring up with the mobile phase. Isocratic reversed-phase liquid chromatography was carried out on a C18 column (120A 4µ 150×4.6mm.) the mobile phase was 0.1 M potassium phosphate-acetonitrile (75:15) pH3.1. The excitation and emission wavelengths were set at 230 and 315 nm, respectively.

Benzoyllecgonine was synthesized by hydrolysis of cocaine at alkaline pH. Calibrators for benzoyllecgonine were prepared at the concentrations from 67 to 6716 ng/ml, the correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.99; calibrators for cocaine were prepared from 86 to 4295 ng/ml,  $R^2$  was 1.

Results of benzoyllecgonine were compared with those obtained, on the same sample, by the immunometric KIMS metod (COBAS INTEGRA). Linear regression for the methods comparison shows close agreement of both slope (b) and intercept (a) with the target values of 1.00 and zero. Considering all the samples, the correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.97 and the result of t Student test (confidence 95%) were: a=0 p=26.9%; b=1, p<0.001%. Considering samples <4000ng/ml, the  $R^2$  was 0.99 and the result of t Student test (confidence 95%) were: a=0 p=97.5%; b=1 p=58.2%. An additional analysis by the Anova test demonstrated that the difference between HPLC and KIMS method was not significant p=92.5%.

J Appl Toxicol. 2005 May-Jun;25(3):200 Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Fernandez P, Vazquez C, Morales L, Bermejo AM.

**128****VALUTAZIONE DEL METODO MEIA / IMx PER IL MONITORAGGIO DEL SIROLIMUS**

Panzali A., Spalenza F.  
3° Laboratorio Analisi, A.O. Spedali Civili di Brescia

Il monitoraggio terapeutico del Sirolimus è stato considerato indispensabile per una corretta gestione della terapia in quanto: (1) è metabolizzato dal citocromo P450-3A4 epatico ed intestinale e le sue concentrazioni sono largamente influenzate dalla cosomministrazione di induttori o inibitori enzimatici o dalla presenza di insufficienza epatica; (2) dopo trapianto presenta un'ampia variabilità farmacocinetica interindividuale; (3) sono stati definiti gli intervalli terapeutici sia se utilizzato come immunosoppressore maggiore con micofenolato e steroide (12 – 20 ng/mL) che in associazione agli inibitori delle calcineurine (4 – 12 ng/mL); (4) se utilizzato in associazione alla Ciclosporina ne incrementa la nefrotossicità che può essere prevenuta ottimizzando i livelli di entrambi i farmaci. Tuttavia la non disponibilità di metodi immunochimici ha portato alla centralizzazione delle misure del Sirolimus e ne ha limitato l'uso.

**Scopo** di questo studio è stato quello di valutare le prestazioni del nuovo metodo - ditta Abbott, disponibile da agosto 2004 - per la determinazione del farmaco Sirolimus al fine di utilizzarlo per il monitoraggio delle terapie immunosoppressive per la profilassi del rigetto acuto e cronico dopo trapianto di rene.

**Metodi.** Calibratori, campioni e controlli (matrice: sangue intero / EDTA) sono pretrattati con reagente lisante e centrifugati; il supernatante è analizzato con tecnologia MEIA e strumento IMx, metodo del tutto simile a quello per il dosaggio del tacrolimus, stessa ditta. La valutazione del metodo è stata effettuata mediante determinazione di: precisione (2 corse al giorno per 5 giorni), limite di quantificazione (valore misurabile con un'imprecisione accettabile, < 20%) e confronto con metodo di riferimento HPLC (117 campioni conservati fino a 5 mesi a - 80°C, da 43 pazienti trapiantati di rene da 5 giorni a più di 6 mesi; posologia sirolimus da 0,5 a 5 mg/die).

**Risultati.** L'imprecisione (CV) tra giorni è di 3,1, 6,4 e 9,6 % rispettivamente per concentrazioni di Sirolimus di 5, 11 e 22 ng/L. Il limite di quantificazione è di 2 ng/mL. **Correlazione** con metodo HPLC/UV:

MEIA = 1,1597 HPLC + 0,7009  $r^2 = 0,767$

Bias, %: +25,5 (mediano); da -33,3 a +96,2

Il Bias, % è inversamente correlato al tempo intercorso dal trapianto ( $r^2 = 0,730$ ).

**Conclusioni.** Il metodo MEIA misura il sirolimus con imprecisione e sensibilità accettabili.

L'inaccuratezza messa in evidenza è probabilmente dovuta a reattività crociata con alcuni metaboliti la cui concentrazione varia in dipendenza di: fenotipo / genotipo metabolico; funzionalità epatica; tempo dal trapianto e tipo; terapie concomitanti. Tale aspecificità deve essere considerata nell'interpretazione dei risultati e nel mutuare gli intervalli terapeutici definiti con metodo di riferimento HPLC.

(1) Clin Ther 2000;22, suppl.B:B1-B132.

**129****IL METODO IMMUNOENZIMATICO IMx PER IL DOSAGGIO DEL SIROLIMUS: L'ESPERIENZA DI UN ANNO**

Mosso R.<sup>1</sup>, Moscato D.<sup>1</sup>, Salvo R.<sup>1</sup>, Bellati P.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche "Baldi e Riberi". A.S.O. San Giovanni Battista (sede Molinette). Corso Bramante, 88/90 - 10126 Torino; <sup>2</sup>Abbott Diagnostics - Roma  
Email: [rmosso@molinette.piemonte.it](mailto:rmosso@molinette.piemonte.it)

**Introduzione.** Il Sirolimus, farmaco capace di una potente azione immunosoppressiva, è indicato per la profilassi del rigetto d'organo in pazienti che hanno ricevuto trapianto di rene. Nella nostra casistica figurano, inoltre, pazienti che hanno ricevuto trapianto di midollo osseo.

La disponibilità del dosaggio Sirolimus è molto importante soprattutto per i pazienti ad alto rischio di rigetto per cui è fondamentale avere a disposizione un metodo di dosaggio del farmaco immunodepressivo che sia specifico, sensibile, riproducibile e di facile esecuzione per il laboratorio. Da quasi un anno il nostro laboratorio ha introdotto il dosaggio del Sirolimus su IMx (Abbott Diagnostics; ILL., USA) basato sul principio MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) Di questo dosaggio abbiamo valutato le prestazioni analitiche ed i possibili vantaggi pratici rispetto al sistema di analisi in HPLC-UV. Abbiamo monitorato inoltre 15 pazienti con problemi oncoematologici (n=14) ed uno con tumore solido, sottoposti a HSTC (hemopoietic stem cell transplantation) allogenico cui è stato somministrato sirolimus secondo un protocollo specifico.

**Materiali e Metodi.** In entrambe le metodiche si è utilizzato sangue intero anticoagulato con EDTA in cui la Rapamicina è stabile per 28 giorni a 2-8°C e per più di tre mesi a - 20°C.

Abbiamo valutato con il metodo immunoenzimatico la ripetibilità intraserie (su due campioni nativi) e interserie (su tre controlli del kit) calcolando le medie, le deviazioni standard e i CV%. È stata, inoltre valutata la correlazione con HPLC-UV mediante analisi di campioni a concentrazione sconosciuta.

**Risultati.** Ripetibilità intraserie: I° campione: n = 10, media = 12.0 (11.6-12.7), ds = 0.32, CV% = 2.7; II° campione: n = 10, media = 24.5 (23.3-26.8), ds = 1.33, CV% = 5.4; Ripetibilità interserie: Controllo L: n = 24, media = 5.0 (4.3-5.5), ds = 0.33, CV% = 6.49; Controllo M: n = 24, media = 10.3 (9.2-11.8), ds = 0.57, CV% = 5.53; Controllo H: n = 24, media = 20.8 (17.2-22.8), ds = 1.33, CV% = 6.38.

Sono stati inoltre analizzati, per valutare l'accuratezza del metodo MEIA, alcuni controlli di Proficiency Testing correlandoli con una metodica di riferimento LC/MS. I risultati sono i seguenti: n = 45, r Pearson = 0.9639, Retta di correlazione di Passing e Bablok: IMX=1.1226 \* LC/MS - 0.7275, Bias (Altman e Bland) = - 1.053.

**130****UTILITA' CLINICA DELLA DETERMINAZIONE DI CLOZAPINA E NORCLOZAPINA IN HPLC.**

Rastelli M., Santori L.  
Laboratorio Analisi Cliniche – Ospedale Civile - Piacenza

La Clozapina è un antipsicotico atipico la cui molecola, simile a quelle degli antidepressivi tricyclici, agisce su molti tipi di recettori cerebrali: D1, D2, D4, 5-HT<sub>2</sub>, alfa<sub>1</sub>, H1 e M1. Il meccanismo d'azione non è ancora completamente accertato, ma pare causato dall'antagonismo bilanciato anti D/anti 5-HT: la clozapina occupa i recettori D e 5-HT, ma il legame con i recettori D ha breve durata, permettendo il ripristino dell'attività dopaminergica nello striato e nella corteccia frontale: così si spiega la mancanza degli effetti extrapiramidali e della iperprolattinemia caratteristici degli altri comuni antipsicotici. Purtroppo però la Clozapina può causare agranulocitosi. Pare anche accertato che il catabolita Norclozapina sia il principale responsabile della agranulocitosi.

Scopo di questo lavoro è verificare se nei casi da noi osservati la concentrazione della Norclozapina abbia raggiunto valori particolarmente elevati.

Materiali e metodo. Abbiamo usato reattivi BIORAD per l'analisi delle benzodiazepine e degli antidepressivi tricyclici. Calibratori e controlli sono sieri forniti dalla Chromsystems. Il procedimento comprende l'aggiunta di uno standard interno ( Trimipramina maleato della Sigma) ai campioni di siero, l'adsorbimento su colonnine di estrazione bonded phase, l'eliminazione delle benzodiazepine e infine l'eluizione della clozapina e della norclozapina mediante l'eluente per gli antidepressivi tricyclici. La separazione HPLC viene eseguita su colonna a fase inversa a 35°C rilevando l'assorbanza a 242 nm.

Risultati. Abbiamo analizzato 286 campioni di siero afferenti al nostro laboratorio da Reparti Ospedalieri o da Cliniche private, verificando che:

- 1) in essi la Norclozapina è presente in percentuale variabile tra il 18% e il 126 % rispetto alla concentrazione della Clozapina;
- 2) in 21 campioni la concentrazione della Clozapina oltrepassa il limite superiore dell'intervallo terapeutico (230-615 ng/mL);
- 3) la Norclozapina è particolarmente elevata – anche percentualmente – nei campioni ad alta concentrazione di Clozapina;
- 4) in 3 campioni di siero con Clozapina ancora compresa nell'intervallo terapeutico la concentrazione della Norclozapina risulta maggiore di quella della Clozapina;

Conclusioni. Almeno nei casi 3) e 4) è doveroso quantificare la Norclozapina anche se non è espressamente richiesta. Infatti essa è un metabolita attivo tossico. Nell'impostazione della terapia occorre tener presente questo segnale di allarme. Fortunatamente l'ipo/ agranulocitosi è reversibile, non è frequente, ma se è trascurata può diventare pericolosa.

**131****VALIDAZIONE DI UNA METODOLOGIA DI LAVORO PER LA DETERMINAZIONE DELLA TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE**

Casali D., Filocamo M., Tura M., Arlotti C., Peruzzi F., Arcangeli M., Semprini B., Di Pinto A., Ceroni V.  
U.O. Medicina di Laboratorio - Ospedale Infermi Rimini

La transferrina carboidrato carente (CDT) è uno dei parametri utilizzati dalla Commissione Medico Locale per il rilascio della idoneità alla guida dopo sospensione della patente per violazione dell'art. 186 del Codice della Strada.

Rivestendo il dato analitico una enorme importanza in ambito medico legale, si è cercato di adottare una metodologia di lavoro a garanzia di un processo affidabile ed accurato.

A tale scopo nel nostro laboratorio, è stata implementata una metodologia di lavoro che prevede un test di screening ed un successivo test di conferma e su tutti i campioni dubbi e su quelli positivi.

Il test di screening è un test immunochimico eterogeneo con separazione in colonna seguita dalla misurazione della quantità di transferrina carboidrato carente in proporzione alla transferrina totale (% CDT TIA version Standard, kit commercializzato dalla ditta Bio-Rad).

Il test di conferma viene eseguito in cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC) su colonne a scambio anionico, con rivelazione per assorbimento UV a 460 nm, su sistema Agilent 1100. La misurazione a 460 nm risulta altamente specifica, in quanto vengono determinate in maniera selettiva solo le transferrine saturate di ferro, (%CDT by HPLC, kit della ditta Bio-Rad).

I limiti di riferimento adottati dal nostro laboratorio per il test immunochimico vengono così esplicitati:  
negativi: campioni inferiori a < 2.6 % di CDT  
borderline: campioni da 2.6 a 3.0 % di CDT  
positivi: campioni > 3.0 % di CDT

Valore soglia per il test cromatografico è > 2.0 % di CDT

In tre mesi di studio sono stati analizzati 452 campioni, dei quali il 26%, presentava valori di CDT > 2.6% della transferrina totale. Nello specifico 54 avevano un valore compreso tra 2.6 e 3.0 % di CDT (gruppo A) - 64 erano superiori a 3.0 (gruppo B).

La positività nel gruppo A è risultata del 22 % , nel gruppo B dell'81%.

L'analisi dei dati evidenzia la criticità della finestra 2.6-3.0. L'incongruenza dei risultati, è a nostro avviso dovuta alla minore precisione del metodo immunochimico rispetto al test in HPLC, particolarmente per valori intorno al cut-off. La falsa positività su due campioni del gruppo B è dovuta alla presenza della variante genetica D della transferrina, a conferma che la cromatografia rileva varianti che

## 131

possono interferire nella determinazione immunochimica.

A nostro avviso pertanto l'adozione di questa tipologia metodologica aumenta la performance diagnostica migliorandone sensibilità e specificità.

*Bibliografia*

Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate

-deficient Transferrin Quantification in the Identification of

Alcohol Abuse

Anders Helander, Gunne Eriksson, Helena Stibler and J.O.Jeppsson

Clinical Chemistry 47: 1225-1233, 2001

## 132

DETERMINAZIONE DELL'ARECOLINA IN MATRICI BIOLOGICHE NON CONVENZIONALI DOPO ESPOSIZIONE ATTIVA E PASSIVA ALL'ARECA NUT

Marchei E.<sup>1</sup>, Pellegrini M.<sup>1</sup>, Pichini S.<sup>1</sup>, Garcia-Algar O.<sup>2</sup>, Pacifici R.<sup>1</sup>, Zuccaro P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento del Farmaco Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy. <sup>2</sup>Paediatric Service, Unitat de Recerca Infància i Entorn (UIRE), Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

L'areca nut (il frutto dell'albero dell'*Areca catechu*) è la droga più comunemente utilizzata dalle popolazioni asiatiche e dalle comunità asiatiche che vivono in Europa e in nord America. Usualmente, la noce è tagliata in sottili frammenti uniti con una varietà di ingredienti naturali (ad esempio il tabacco o il lime). Tra i diversi componenti dell'areca nut, l'arecolina è l'alcaloide presente in maggiore percentuale e che presenta attività colinergica.

Recentemente è stato messo a punto un metodo per la determinazione di questo alcaloide in diverse matrici biologiche neonatali mediante cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa. La concentrazione dell'arecolina è stata determinata nel meconio, sangue di cordone ed urina di neonati di madri asiatiche e nella placenta materna (a cui sono stati associati anche studi morfologici) per valutare l'esposizione prenatale a questo alcaloide e l'eventuale associazione con problemi di salute nel neonato. Sui trentadue campioni analizzati, l'arecolina è stata riscontrata in 4 campioni di meconio in un rango di concentrazioni di 0.007-0.022 microngrammi/grammo di meconio (in un caso anche urina e sangue di cordone) ed in 5 campioni di placenta (0.009-0.015 microngrammi/grammo di placenta) di neonati le cui madri hanno dichiarato il consumo di Areca nut durante la gravidanza. Due dei neonati prenatalmente esposti all'arecolina hanno mostrato crisi di astinenza neonatale, basso peso ed ipotonia.

E' stata inoltre determinata la presenza dell'arecolina e della nicotina nei capelli di consumatori abituali di areca nut sotto forma di bettle nut (sigaretta di areca nut e tabacco). Negli undici campioni analizzati (7 uomini e 4 donne) tutti contenevano sia arecolina e nicotina. Nessuna correlazione è stata riscontrata tra la concentrazione di arecolina trovata e la quantità consumata e gli anni di consumo. Il valore medio del contenuto in arecolina e nicotina nei capelli (1.26 e 3.51 ng/mg per le donne, 0.49 e 6.48 ng/mg per gli uomini) sono in accordo con la letteratura internazionale in cui si riporta la tendenza degli uomini ad associare il consumo di areca con quello del tabacco in percentuale maggiore rispetto alle donne.

L'analisi dell'arecolina nel meconio, nella placenta, nell'urina e nel sangue di cordone permette di stabilire se il feto nella vita intrauterina è stato esposto a tale sostanza. Dall'analisi nei capelli si evidenzia invece l'eventuale uso cronico delle madri e del loro partner.

(1) Pichini S. et al. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003; 17: 1958-1964.

**133****MONITORAGGIO CON METODO MEIA DEI LIVELLI DI SIROLIMUS IN PAZIENTI CON TRAPIANO RENALE**

Barbaro A.<sup>1</sup>, Bellati P.<sup>2</sup>, Esposito E.<sup>1</sup>, Menozzi I.<sup>1</sup>, Sparacino V.<sup>3</sup>

1- Lab. Patologia Clinica, A.R.N.A.S. Civico, Palermo; 2- Abbott Diagnostic, Roma; 3-U.O. Centro Trapianti di rene, A.R.N.A.S. Civico, Palermo.

**Introduzione:** Sirolimus è un immunosoppressore per la prevenzione del rigetto acuto in pz. con trapianto di rene; il suo meccanismo d'azione è l'inibizione dell'attivazione del linfocita T, attraverso il legame con il TOR. Il farmaco viene assorbito dal tratto gastroenterico, la sua emivita è di 62 h e lo steady state, dopo variazione della posologia, è di 5-6 giorni. Vista l'esigenza di risposte affidabili e veloci per una terapia ottimale antirigetto acuto, è stata utilizzata una metodica ELISA, più praticabile dell' HPLC, per un controllo (previa valutazione della performance del metodo) dei livelli di pre-dose di sirolimus (somministrato con inibitori della calcineurina o con Micofenolato e steroidi), in 60 trapiantati di rene da donatore deceduto.

**Materiali e metodi:** Il dosaggio di Sirolimus è stato effettuato con metodo MEIA in sistema IMX-ABBOTT; i campioni, prelevati in condizioni di steady state, sono stati processati subito ovvero conservati a 0-8° per un massimo di 7 giorni. La performance del metodo è stata valutata su 33 repliche di controlli a 3 concentrazioni (L,M,H).

Il range di riferimento utilizzato è di 5-15 ng/ml.

**Risultati e conclusioni:** Tutti i risultati dei controlli rientrano nel range di accettabilità previsto e l'imprecisione totale (Cva) per i 3 livelli è di 13%, 12,4%, 10%. I valori in serie nei vari pz. (Vi) mostrano una certa stabilità dei livelli raggiunti dal farmaco, anche dopo aggiustamento della posologia

(CVi < 15%). È in studio la valutazione della variabilità inter-individuale di risposta ad identici regimi terapeutici di Sirolimus in diverse associazioni; dai primi risultati, riferiti ad osservazioni prevalenti per CYA, i livelli medi di sirolimus (ng/ml) in pz. nei vari regimi (Cya; FK; MFA) sono rispettivamente: 16,3 (2 mg/die) e 8,2 (variazione a 1 mg/die); 4,0 (2 mg/die); 14,0 (2 mg/die) e 7,7 (variazione a 1 mg/die). Una valutazione più accurata, nelle diverse combinazioni, potrà essere effettuata con un numero più consistente di osservazioni per gruppi omogenei.

**Bibliografia:** National PBM Drug Monograph Sirolimus (Rapamune) [www.vapbm.org](http://www.vapbm.org)

**134****SIMULTANEOUS DETERMINATION OF OPIATES, METHADONE, COCAINE AND METABOLITES, CANNABINOIDS IN HAIR USING GC/MS.**

Aventaggiato L.; Gagliano-Candela R.  
Forensic Toxicology Chair, Internal Medicine and Public Medicine Dept., University of Bari, Italy  
E-mail: [gagliano@toxicolfor.uniba.it](mailto:gagliano@toxicolfor.uniba.it)

A procedure is presented for simultaneous analysis of morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine, methadone, cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methylester, cocaethylene, tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair of drug of abuse addicts. The method involves decontamination in sodium dodecyl sulfate 1%, distilled water, and methanol, pulverization in a ball mill, addition of deuterated internal standards, heat extraction in methanol. The extracts were evaporated to dryness and analyzed with gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) before and after BSTFA/TMCS 1% silylation. The extracts were analyzed using electron impact gas chromatography/mass spectrometry operating in selected ion monitoring mode.

**135****CAMPIONAMENTO ATTIVO E PASSIVO NEL MONITORAGGIO AMBIENTALE DEL SEVORANO. STUDIO PRELIMINARE.**

\*Bagnati M., <sup>†</sup>Barbic' F., \*Basile M., \*Cassani C., \*Fortina A., <sup>†</sup>Mantovani C., \*Porta P., <sup>†</sup>Zanoli V., \*Bellomo G.

\*Laboratorio RRCC, <sup>†</sup>Medicina del Lavoro - Azienda Osp. "Maggiore della Carità" Novara

**Introduzione**

Il sevorano è un gas anestetico che negli ultimi anni ha avuto un'ampia diffusione nell'induzione e mantenimento dell'anestesia generale. Il campionamento attivo sugli operatori di sala presenta problemi di intralcio al lavoro a causa delle dimensioni delle batterie e della pompa collegate al campionatore. Da qui la necessità di passare a campionatori passivi di ingombro trascurabile.

**Scopo del lavoro**

Verificare la sovrapposizione dei dati ambientali di sevorano ottenuti sugli stessi operatori con i due tipi di campionatori e verificarne la correlazione con i valori del metabolita urinario esafluoroisopropanolo (HFIP).

**Materiali e metodi**

I dosaggi dell'HFIP urinario si eseguono dopo idrolisi enzimatica tramite la tecnica HS/GC/MS; il sevorano ambientale viene dosato sia sulle fiale per campionamento attivo, sia sui campionatori passivi dopo eluizione con miscela acqua/metanolo mediante la tecnica HS/GC/MS.

**Risultati.**

Sono stati monitorati 15 operatori di sala con diverso ruolo; i valori di sevorano per il campionamento attivo hanno dato una media di  $5.0 \pm 6.4$  mg/m<sup>3</sup> e di  $6.5 \pm 8.4$  per il campionamento passivo; il monitoraggio biologico degli operatori mediante HFIP ha dato una media di  $522 \pm 644$  µg/g<sub>crea</sub>. La correlazione tra i valori di sevorano per i campionatori attivi e passivi presenta un  $R^2 = 0.985$ ; il sevorano dosato sui campionatori attivi correla con i valori di HFIP con  $R^2 = 0.792$  mentre il sevorano dosato sui campionatori passivi correla con i valori di HFIP con  $R^2 = 0.723$ .

**Conclusioni.**

Da questo studio si evidenzia sia una buona sovrapposibilità tra i dati ottenuti con i due tipi di campionamento sia tra i due tipi di campionatori, sia tra i dati ambientali ottenuti con i due metodi nei confronti dei dati biologici di HFIP. Tuttavia questo studio risulta solo preliminare a causa del numero limitato di casi e della necessità di affinare il calcolo utilizzato per i campionatori passivi per trasformare il valore di sevorano dosato in mg/m<sup>3</sup>.

**Riferimento bibliografico.**

Imbriani M, Ghittori S, Pezzango G, Capodaglio E. Anaesthetic in urine as biological index of exposure in operating room personel. J.Toxicol.environ.Health. 1995; 49, 135-140.

**136****DOSAGGIO DI 10,11-DIIDRO-10-IDROSSI-CARBAMAZEPINA NEL MONITORAGGIO TERAPEUTICO DELL'OXCARBAZEPINA.**

\*Porta P., \*Bagnati M., \*Basile M., <sup>†</sup>Cantello R., \*Cassani C., <sup>†</sup>Civardi C., \*Fortina A., \*Bellomo G.

\*Laboratorio RRCC, <sup>†</sup>Clinica Neurologica - Azienda Osp. "Maggiore della Carità" Novara

**Introduzione.**

Nel trattamento dell'epilessia si sta diffondendo l'utilizzo dell'oxcarbazepina utile nelle crisi parziali con o senza generalizzazione secondaria e crisi generalizzate tonico-cloniche. Nell'organismo l'oxcarbazepina viene rapidamente trasformata nel metabolita attivo 10,11-diidro-10-idrossi-carbamazepina.

**Scopo del lavoro.**

Sviluppare una metodica di semplice e rapida esecuzione utile nel monitoraggio terapeutico dei farmaci del metabolita attivo dell'Oxcarbazepina il cui range terapeutico non è ancora ben definito.

**Materiali e metodi.**

La metodica prevede l'utilizzo di 100 µL di plasma o siero deproteinizzati mediante acido metafosforico; l'analisi avviene in HPLC in fase inversa con rivelazione UV a 212 nm. La fase mobile è costituita da un tampone fosfato ed acetonitrile. Come calibratore si utilizza un pool di sieri testati come bianchi a cui è stata aggiunta una quantità nota di standard.

**Risultati.**

Il metodo è lineare tra 0,5 e 80 mg/L ( $R^2 = 0.9997$ ); il limite di quantizzazione è di 0.1 mg/L ed il CV% è di 0.52 intraassay e 6,05 interassay. Nei pazienti da noi indagati (n=23) è stata riscontrata una concentrazione media di  $17,6 \pm 9,1$  mg/L (min = 0,1 ; max = 31,8).

**Conclusioni.**

Il metodo, pur prevedendo un trattamento del campione ed un'analisi in HPLC, risulta essere molto veloce (tempo complessivo inferiore ai 15 minuti) tanto da essere comparabile ai comuni metodi automatici (FPIA, EMIT) utilizzati comunemente per i farmaci, ma non ancora disponibili per il dosaggio del solo metabolita attivo dell'oxcarbazepina; inoltre la metodica HPLC presenta il vantaggio di non risentire dell'interferenza dell'oxcarbazepina, della carbamazepina e degli altri farmaci normalmente monitorati.

**Riferimento bibliografico.**

G.P.Menge, J.P.Dubois, G.Bauer. Simultaneous determination of carbamazepine, oxcarbazepine and their main metabolites in plasma by liquid chromatography. J of Chromatography, 1987 March 6; 414: 477-483.

## 137

DOSAGGIO DELLA NEOPTERINA URINARIA  
NELLA TERAPIA CON INTERFERONE BETA-1B  
NELLA SCLEROSI MULTIPLA

Pigini.P., Tocchini M., Tonnini M.C.\*

Laboratorio Analisi Ospedali Riuniti Ancona

\*Dipartimento Scienze Mediche Chirurgiche Università di Ancona

La neopterinina è una molecola della famiglia delle pteridine, prodotta dai monociti/macrofagi umani in risposta alla stimolazione con gamma interferon ; la titolazione sierica o urinaria della neopterinina risulta utile quale indicatore in patologie caratterizzate dall'attivazione del sistema immunitario.

Il nostro studio ha preso in esame un campione di 24 pazienti affetti da sclerosi multipla remittente-ricidivante (SMRR) in cui è stato valutato l'incremento della neopterinina urinaria nei soggetti malati rispetto ai controlli sani. Tale incremento è stato valutato attraverso la determinazione del rapporto tra la concentrazione urinaria di neopterinina e creatinina (UNCR , urinary neopterin to creatinine ratio ) come riportato in tabella :

	SMRR	Controlli
N. partecipanti allo studio	24	15
Maschio n(%)	9 (37,5)	7 (46,7)
Femmina n(%)	15 (62,5)	8 (53,3)
Età( anni) (media+ DS)	32,8 ± 7,6	36,6 ± 8,6
Durata di malattia (mesi) (media + DS)	76,1 ± 69,5	
EDDS (media+DS)	1,7 + 0,6	
N. di ricadute nei 2 anni prece-denti lo studio (Media + DS)	2,4±0,7	
Tempo dall'ultima ricaduta (giorni)(media + DS)	122,8 ± 53,2	
UNCR (media + DS)	154,1±61,1	111,2 ± 48,5

Nello stesso campione di pazienti ,sottoposti alla somministrazione di interferon beta-1b (IFNβ-1b ) sono stati valutati i valori di UNCR urinaria pre-IFNβ-1b ,a una settimana e al 6° mese di terapia allo scopo di dimostrare come l'incremento della neopterinina risulti espressione sia dell'attività immunologica fisio-patologica correlata alla SM sia dell'attività farmacologia dell'IFNβ-1b come da tabella:

	UNCR basale pre-IFN	UNCR 1°settimana post-IFN	UNCR 6°mese
N°	24	24	24
Media	154.1	334.8	323.7
Min	31	82.2	58.7
Max	296.8	703.6	937
Mediana	152.5	324.8	251.9
DS	61.1	135.9	212.7

I livelli urinari di neopterinina e di creatinina sono stati determinati mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

Conclusioni: i risultati ottenuti confermano il ruolo della neopterinina quale indicatore dell'attività infiammatoria presente nella SM e della bioattività dell'IFNβ-1b pur presentando il limite intrinseco ai markers biologici dovuto alla variabilità inter-individuale ed intraindividuale.

## 138

CONFRONTO TRA UN METODO IN HPLC-MS/MS  
E UN METODO IMMUNOENZIMATICO A  
CATTURA DI MICROPARTICELLE (MEIA) PER  
MISURARE LA CONCENTRAZIONE EMATICA DI  
RAPAMICINA IN PAZIENTI TRAPIANTATI

C. Gechtman, A. Marocchi, F. Zoppi

Lab. Analisi Chimico Cliniche, AO Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano.

Email: [tossicologia@ospedaleniguarda.it](mailto:tossicologia@ospedaleniguarda.it)

La quantificazione del sirolimus o rapamicina (RPM) in sangue intero è parte integrante del corretto uso clinico di questo immunosoppressore. Il metodo a disposizione è la cromatografia liquida con rilevatori UV o MS, specifici per la quantificazione della molecola di RPM. Un nuovo immunodosaggio che utilizza una tecnica con microparticelle (MEIA) è stato recentemente introdotto per l'uso su IMx<sup>®</sup> (Abbott Diagnostics). Questa tecnica possiede diversi vantaggi sul metodo in HPLC in termini di facilità d'uso, disponibilità di strumentazione e semi automazione.

L'obiettivo di questo studio è stato di confrontare un metodo validato in HPLC con rilevazione in spettrometria di massa a trappola ionica (MS/MS) con l'immunodosaggio MEIA in campioni di sangue di pazienti sottoposti a trapianto di rene. Le misure sono state eseguite in diversi periodi del "post-trapianto", in terapia di mantenimento (intervallo tra dosaggi: 24 ore), su campioni raccolti prima della dose mattutina di RPM (C<sub>trough</sub>). Nei 190 campioni di sangue analizzati, la concentrazione media (± 1SD) di RPM, misurata in HPLC-MS/MS, è stata di 8,8 ± 5,9 ng/mL. Il valore corrispondente di RPM ottenuto in MEIA è stato di 9,1 ± 6,1 ng/mL.

Il grafico di Bland-Altman ha dimostrato che la tecnica MEIA fornisce risultati simili a quelli dell'HPLC-MS/MS. Per un ambito di concentrazioni misurato in HPLC-MS/MS compreso tra 0 e 37,2 ng/mL, la differenza assoluta media tra MEIA e HPLC-MS/MS è stata di 0,3 ± 1,8 ng/mL (intervallo: -6,6 ÷ +8,0 ng/mL), corrispondente ad una differenza relativa di 6,3% ± 31% (media ± 1SD).

Usando la regressione lineare è stata trovata una buona correlazione tra i due metodi: [MEIA] = 0,99 x [HPLC-MS/MS] + 0,36; r<sup>2</sup> = 0,91.

In conclusione, entrambe le tecniche, HPLC-MS/MS e MEIA, hanno prodotto risultati soddisfacenti nell'analisi dei campioni clinici.

**Bibliografia:**

Holt DW. Sirolimus – another drug to measure? *Syva drug monitoring. The journal of DB limited.* 2003; 4(1): 3-6.

## 139

## DETERMINAZIONE DELL'EVEROLIMUS (RAD) CON METODI IMMUNOCHEMICI: IMx VS TDx

Gechtman C, Marocchi A, Zoppi F.  
Lab An. Ch. Cl.- AO Osp. Niguarda Cà Granda, Milano

La 40-O-(2-idrossietil)-rapamicina o *everolimus* - (SDZ RAD, acronimo da RApamycin Derivative, Novartis Certican®) è un derivato dalla rapamicina (RPM) -lattone macrolide prodotto dalla fermentazione dello *Streptomyces hygroscopicus*-. Questo farmaco immunosoppressore, dotato di maggiore polarità rispetto alla RPM è stato sviluppato nel tentativo di migliorarne la farmacocinetica, aumentandone la biodisponibilità orale. Il RAD e la RPM hanno un meccanismo d'azione simile: bloccano i segnali di trasduzione indotti dai fattori di crescita nelle cellule T in risposta al legame con l'alloantigene. La sua azione è più tardiva rispetto a quella degli inibitori della calcineurina ciclosporina e tacrolimus. Il monitoraggio terapeutico (TDM) del RAD nel sangue è importante per definire il regime di dosaggio, la farmacocinetica e l'intervallo terapeutico, per valutare potenziali interazioni con altre molecole, e perché la farmacocinetica del RAD in pazienti dopo trapianto solido presenta un'elevata variabilità interindividuale. I metodi ufficialmente disponibili per la determinazione del RAD includono metodi fisico-chimici (HPLC-MS/MS e HPLC-UV) e un immunodosaggio FPIA applicato al TDx (Abbott). Nel nostro laboratorio la RPM viene misurata col metodo MEIA su IMx (Abbott).

**Obiettivo:** Visto che le strutture di RPM e RAD differiscono solo per un gruppo etossi, e le due molecole hanno elevata reattività crociata negli immunodosaggi, abbiamo provato a saggiare il RAD sul sistema MEIA col kit specifico per la RPM confrontando i risultati con quegli ottenuti sul sistema FPIA (kit specifico per il RAD) e con l'HPLC-MS/MS.

**Risultati:** Correlazione TDx/HPLC:  $TDx = 1,16 \times HPLC + 1,11 \text{ ng/mL}$ ,  $r^2 = 0,73$ ,  $S_{y,x} = 3,07 \text{ ng/mL}$ ,  $n = 100$

Nei 70 campioni saggiati con entrambi i metodi immunochimici la concentrazione media  $\pm$  1SD di RAD in sangue misurata su TDx è stata di  $10,2 \pm 7,6 \text{ ng/mL}$ , mentre quella misurata su IMx è stata di  $9,8 \pm 6,9 \text{ ng/mL}$ . Il grafico di Bland-Altman ha dimostrato che la tecnica IMx da risultati simili a quelli del TDx. La correlazione tra metodi immunochimici, ottenuta usando la regressione lineare è stata:  $IMx = 1,02 \times TDx + 0,24 \text{ ng/mL}$ ;  $r^2 = 0,88$ ;  $S_{y,x} = 2,67 \text{ ng/mL}$ ,  $n = 70$ .

I nostri dati dimostrano che, data la specificità relativamente larga degli antisieri usati nei metodi immunochimici che portano a risultati sovrapponibili per le due tecniche -IMx e TDx-, quella su IMx ha diversi vantaggi procedurali (minore quantità di campione impiegato, non utilizzo di metanolo -solvente altamente volatile e tossico-, procedimento analitico comune per le due molecole). Resta da definire se anche dal punto di vista del clinico la relativa inaccuratezza del risultato analitico possa incidere sul trattamento del paziente.

**Bibliografia:** Chapman TM, Perry CM. *Drugs* 2004;64:861-72

## 140

## CONFRONTO TRA METODICA MEIA E HPLC NEL DOSAGGIO DEL SIROLIMUS

Castellana C.N.; Pini L.A.; Gallesi D.; Brovia D.; Pinetti D.; Bertolini A.

Laboratorio Struttura Complessa di Tossicologia e Farmacologia Clinica - Policlinico di Modena

I farmaci immunosoppressori sono caratterizzati da un'elevata variabilità individuale nella farmacocinetica, associata ad un ristretto indice terapeutico. Il monitoraggio terapeutico del sirolimus è pertanto necessario per stabilire un adeguato dosaggio individuale del farmaco. I metodi attualmente esistenti per il dosaggio del sirolimus sono in cromatografia liquida (metodica di riferimento) ed in immunoenzimatica.

In questo studio è stata valutata la metodica immunometrica MEIA (Abbott) rispetto a quella cromatografica (HPLC) nel dosaggio del sirolimus (SRL) nella nostra realtà. Sono stati analizzati campioni di sangue intero provenienti da 100 pazienti, sottoposti a trapianto d'organo presso i Centri Trapianto dell'Emilia Romagna ed altre regioni d'Italia, in trattamento con SRL nel periodo compreso tra maggio e agosto 2004. I campioni, divisi in 2 aliquote al momento dell'arrivo in laboratorio, sono stati conservati a  $-20^\circ\text{C}$  e analizzati successivamente, prima in HPLC e dopo in MEIA.

Lo standard del sirolimus e lo standard interno utilizzati per la metodica in HPLC sono stati forniti dalla Wyeth-Ayerst Research Laboratories. I calibratori e i controlli sono stati preparati in metanolo. La colonna cromatografica utilizzata è una Alltima C18 della Ditta Alltech. L'estrazione del SRL nei campioni è avvenuta tramite sistema liquido/liquido. L'analisi cromatografica è stata effettuata mediante cromatografo liquido della Ditta Beckman tipo System Gold con detector UV, alla lunghezza d'onda di 278 nm.

I reagenti, i calibratori e i controlli utilizzati per la metodica MEIA sono standardizzati (Ditta Abbott cod.5C91-21). I risultati ottenuti sono stati suddivisi in 3 gruppi in base alle concentrazioni di SRL ottenute in HPLC: concentrazioni inferiori a 10 ng/ml, comprese tra 10 e 20 ng/ml e superiori a 20 ng/ml. Le medie calcolate per ciascun gruppo di dati ottenuti con le due diverse metodiche sono state confrontate per mezzo di una retta di correlazione il cui  $r$  è risultato rispettivamente di 0.83, 0.83 e 0.90. La correlazione di tutti i risultati ottenuti con i due metodi mostra un  $r$  di 0.9542. Sono stati inoltre calcolati i CV% di tre diversi livelli di sirolimus con la metodica MEIA ottenendo i seguenti risultati: il livello basso (media: 4.1 ng/ml) ha un CV% di 6.0; il livello medio (media: 12.5 ng/ml) ha un CV% di 5.1 ed il livello alto (media: 18.0 ng/ml) ha un CV% di 6.9. I buoni risultati ottenuti hanno consentito l'applicazione della metodica MEIA nel nostro laboratorio anche sui pazienti precedentemente testati con HPLC.

**Bibliografia**

D.W.Holt, M.Moreton, K. Laamanen, and A.johnston "A Microparticle Enzyme Immunoassay to Measure Sirolimus" *Transplantation Proceedings*, 37,182-184, 2005

**141****DETERMINAZIONE HPLC DEL FARMACO ANTIEPILETTICO LEVETIRACETAM**

Panzali A., Canu L., Carasi F., Spalenza F.  
3° Laboratorio Analisi, A.O. Spedali Civili di Brescia

**Scopo** di questo studio è stato quello di validare le modifiche da apportare all'Antiepileptics HPLC Reagent kit, (BIO-RAD, cod. 195-6000) per il TDM del farmaco antiepilettico levetiracetam (*Keppra*).

Il monitoraggio terapeutico del levetiracetam (LEV) è stato considerato utile per una corretta gestione della terapia antiepilettica in quanto: (1) il suo metabolismo è accelerato dalla contemporanea assunzione di farmaci inducenti (principalmente fenitoina, carbamazepina ma anche oxcarbazepina) con diminuzione dei livelli ematici del 20 – 30 %; (2) la clearance del farmaco è dipendente dall'età, maggiore del 30 – 40 % nei bambini rispetto agli adulti; (3) recentemente, vi è consenso in letteratura sulle concentrazioni da adottare come intervallo terapeutico (12 – 46 mg/L).

**Metodo:** il siero, estratto su colonnine a fase inversa e separato mediante procedura cromatografica HPLC isocratica a fase inversa, è quantificato con rivelatore UV/VIS, senza impiego di standard interno.

**Calibratori:** soluzione madre, St 5g/L: sciogliere una compressa di farmaco Keppra da 500 mg in 100 mL di (acetone nitrile : acqua) (80:20), aliquotare e congelare. St siero 25 mg/L: diluire St 5g/L 1:200 in pool di sieri di pazienti non in trattamento, aliquotare e congelare.

**Controlli:** preparati in laboratorio utilizzando un pool di sieri di pazienti in terapia con Keppra. **Modifiche al metodo e tempo di ritenzione (TR):**

	kit BIO-RAD	Modifiche
Fase mobile	TQ	Diluita 1 : 2,5
Flusso, mL/min	1,4	1,2
Temperatura, °C	50	40
Durata cromat, min	15,5	10 alternare campioni e acetone nitrile
TR LEV, min	-	4,6

**Risultati.** L'imprecisione (CV) tra giorni è di 8,0 e 7,5 % rispettivamente per concentrazioni di LEV di 10 e 20 mg/L. Il limite di determinazione è di 4 mg/L. Non si sono osservate interferenze analizzando il siero di 33 pazienti in terapia con LEV e altri farmaci (amicacina, clobazam, carbamazepina, dipropilacetato, eparina, fenitoina, fenobarbitale, gabapentin, lamotrigina, lorazepam, oxcarbazepina, primidone, topiramato).

**In conclusione,** le modifiche apportate permettono di utilizzare l'Antiepileptics HPLC kit (BIO-RAD) per la misura del levetiracetam.

(1) Ther Drug Monit 2004;26:375-379.

**142****SURFACE-ACTIVATED CHEMICAL IONIZATION IN THE ANALYSIS OF ARGININE IN PLASMA SAMPLES**

Cristoni S.<sup>1</sup>, Brambilla M.<sup>2</sup>, Gonella E.<sup>2</sup>, Gerthoux P.M.<sup>2</sup>, Mocarelli P.<sup>2</sup>, Cavalca V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Milan, Center for Bio-molecular Interdisciplinary Studies and Industrial Applications CISI, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate (Mi)

<sup>2</sup>University Department of Laboratory Medicine, Hospital of Desio, Via Mazzini 1, 20033 Desio ( Mi)

<sup>3</sup>Institute of Cardiology, University of Milan, Via Parea 4, Milano

**INTRODUCTION:** Alteration of arginine plasma levels are involved in several disorders of amino acid metabolism such as hupnup, arginosuccinic aciduria, histidinemia, citrullinuria and cystinuria. A highly sensitive method to study the behavior of arginine from both the qualitative and quantitative points of view is needed to support the diagnosis of the cited disease.

**AIM:** In this work a new liquid ionization source, surface-activated chemical ionization (SACI), has been used to analyze arginine in human and rat plasma samples.

**METHODS:** Arginine was extracted and diluted ten times through protein precipitation. The diluted arginine samples were then analyzed using an ion-exchange chromatographic column coupled with the SACI source and an ion trap analyzer using MS<sup>3</sup> monitoring in order to increase the sensitivity and specificity of the analysis. The multiple-point standard additions method was used to quantify the arginine. This method was employed to eliminate the matrix effect that affects all liquid ionization sources and also does not require use of an internal standard.

**RESULTS:** High-quality results in terms of sensitivity, limit of detection, lower limit of quantitation, linearity and reproducibility are demonstrated. The developed LC/SACI-MS<sup>3</sup> was compared with LC/fluorimetry: the limit of detection for a clean standard solution is 5.7 nmol/L, about 8,5 times more sensitive with respect to LC/fluorimetry. The SACI approach was also used to quantify arginine in hemolyzed plasma samples that are difficult to analyze by the LC/fluorimetry approach.

**CONCLUSION:** The high sensitivity achieved using this approach makes it possible to analyze arginine in dilute samples while avoiding a pre-concentration step.

**Bibliografia:** Vishwanathan et al. "Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Journal of Chromatography B, 2000, 748, 157-166