

143**DOSAGGIO PLASMATICO DEI FITOSTEROLI E DEI PRECURSORI DEL COLESTEROLO IN GAS-CROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA (GC-MS).**

Bertucci P.^a, Ahmida H.S.M.^b, Franzò L.^a, Massoud R.^b, Cortese C.^b, Lala A.^b, Federici G.^a.

^a Laboratorio Analisi, Policlinico Tor Vergata, Viale Oxford 81, 00133 Roma.

^b Dipartimento di Medicina Interna, Università di Tor Vergata, Via Montpellier 1, 00133 Roma.

I fitosteroli (β -sitosterolo e campesterolo) ed i precursori del colesterolo (desmosterolo e latosterolo) sono degli importanti indici biochimici di assorbimento intestinale e di biosintesi epatica del colesterolo, e possono essere considerati utili parametri clinici nello studio delle ipercolesterolemie, della sitosterolemia, dell'aterosclerosi e delle patologie cardiovascolari associate.

E' stato messo a punto un metodo analitico per il dosaggio plasmatico simultaneo dei fitosteroli e dei precursori del colesterolo, utilizzando la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).

La determinazione quantitativa in spettrometria di massa si avvale di un programma di selezione di ioni (SIM), che permette un notevole aumento della sensibilità analitica.

La fase preanalitica si basa sull'idrolisi alcalina (KOH in etanolo) degli esteri sterolici, l'estrazione con una miscela di esano/metanolo degli steroli liberi e la loro derivatizzazione in BSTFA.

L'efficienza dei recuperi per tutti gli steroli varia dal 76 al 101%. Le riproducibilità intra- ed inter-assay di desmosterolo, latosterolo, campesterolo e β -sitosterolo sono state inferiori al 8%, mentre i loro livelli plasmatici in 161 soggetti normali sono (mean \pm SD) 2.37 ± 1.04 , 6.23 ± 3.14 , 3.67 ± 1.95 and 5.92 ± 3.62 μ M rispettivamente.

I risultati sono sovrapponibili con quelli pubblicati in letteratura, che fanno uso di differenti metodiche in GC-FID ed HPLC, ma il metodo sviluppato si è dimostrato più specifico e sensibile, con una migliore riproducibilità per la determinazione simultanea degli steroli plasmatici.

Riferimenti bibliografici:

[1] T.A. Miettinen, H. Gylling, T. Standberg and S. Sarna, *BMJ*, 316 (1998) 1127.

[2] K.M. Phillips, D.M. Ruggio and J.A. Bailey, *J. Chromatogr. B*, 732 (1999) 17.

144**MARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE IN KIDNEY TRANSPLANT: A PILOT STUDY**

Novembrino C.¹, Bonara P.², Campise M.³, Frugoni C.², Todisco G.², Lonati S.⁴, Berardinelli L.¹, Bamonti F.⁴.

¹Dipartimento Scienze Chirurgiche, Università degli Studi di Milano, ²U.O. Medicina Interna, ³U.O. Nefrologia, ⁴Dipartimento Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS di natura pubblica, Via F. Sforza 35, 20122 Milano

The first cause of morbidity and mortality among kidney transplanted patients are cardiovascular diseases due to accelerated atherosclerosis. Corticosteroids and calcineurin inhibitors used for immunosuppression play an important role in the vascular damage; recently, the association between oxidative stress and lymphocyte activation has been evoked in the genesis of the endothelial damage⁽¹⁾. In order to identify some markers of an early damage possibly related with a clinical evolution, we performed a pilot cross sectional study on 17 recipients of a cadaver donor transplantation (9M/8F, aged 39-68, median 55 years) treated with calcineurin inhibitors and with normal renal function (plasma creatinine \leq 1.5 mg/dl). Three out of 17 subjects were diagnosed with neoplasia (liposarcoma, breast cancer, cutaneous lymphoma) 10.3 \pm 8.6 months before. We studied T, B, NK and early and late T-activation markers (CD69+CD3+ and DR+CD3+, respectively) on lymphocytes and two monocytes markers (CD69+CD14+ and DR+CD14+) for cell activation and immunocompetence by three color cytofluorimetric analysis (BD FACScan, software Cell-quest). Serum Reactive Oxygen Species (ROS) were measured by spectrophotometric method (d-ROMs test, Diacron, Italy). Statistical analysis was performed by Student t test.

When compared to our laboratory reference values, all subjects showed percentage of CD3+DR+ T cells and ROS concentrations significantly increased ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) and B cells significantly reduced (CD20+, $p = 0.01$); subjects affected by neoplasia showed CD3+CD4+ T cells percentage significantly increased ($p = 0.008$) and NK cells percentage significantly reduced ($p = 0.007$). Moreover these subjects showed CD3+DR+ T cells percentage significantly increased ($p = 0.017$) than transplanted subjects without neoplasia.

In our preliminary findings, patients present a T cells activation, clearly demonstrated by the cellular phenotype and by ROS concentrations. Moreover, subjects affected by neoplasia seem to differentiate because of a significant reduction of NK and a higher level of T cells activation. If our results will be confirmed in future studies on larger populations, by identifying high risk patients, we have made a step toward the truly tailored immunosuppression.

⁽¹⁾M.S. Williams and J. Kwon, *Free Radic Biol Med* (2004), 37:1144-51

145

MUCOSAL INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY IN WOMEN: IMPLICATIONS FOR PRETERM BIRTH.

Cauci S.¹; Casabellata G.¹; Flatow Culhane J.²; Guaschino S.³

¹Department of Biomedical Sciences and Technologies, School of Medicine, University of Udine, Piazzale Kolbe 4, 33100 Udine, Italy; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19102, USA; ³Department of Reproductive and Developmental Sciences, IRCCS Burlo Garofolo Hospital, School of Medicine, University of Trieste, Trieste, ITALY.

BACKGROUND. Innate immunity is the first line of host defense against microbes at mucosal sites. Bacterial vaginosis (BV) is a microbial/mucosal immunity disorder associated with adverse pregnancy outcomes as preterm birth, low birth weight, and several other adverse outcomes including HIV-1 vertical transmission. *Gardnerella vaginalis* is the main bacterium in BV. We demonstrated that vaginal IgA against the *Gardnerella vaginalis* toxin (anti-Gvh IgA) are protective for adverse pregnancy outcome. Vaginal proinflammatory cytokines have been suggested as determinant of preterm birth. We examined the influence of BV associated virulence factors on vaginal innate and adaptive immunity in women with altered vaginal flora.

METHODS. Concentrations of IL-1beta, IL-8, anti-Gvh IgA, and activities of BV associated microbial enzymes, sialidase and prolidase, were measured in vaginal fluid of singleton pregnant women with BV (according to Nugent score 7-10).

RESULTS. Vaginal IL-1beta concentrations were positively associated with sialidase and prolidase activities. On the contrary, IL-8 was not statistically related to hydrolytic enzymes. However, the ratio of IL-8/IL-1beta was inversely related to sialidase and prolidase activities. Anti-Gvh IgA were positively associated to IL-1beta and IL-8. However, anti-Gvh IgA levels were inversely related to sialidase and prolidase activities.

CONCLUSIONS. High levels of IL-1beta in vaginal fluid has been suggested as risk factor for preterm birth. We first demonstrated that in BV positive women the increase of vaginal IL-1beta is positively associated to activity of hydrolytic enzymes produced by BV-associated bacteria. However, the same enzymes, sialidase and prolidase, depressed the ratio of IL-8/IL-1beta, and the levels of anti-Gvh IgA, in other words the amplification of IL-1beta signal seems to be modulated by activity of BV virulence factors. Our data suggest that microbial hydrolytic enzymes are strongly implicated in modulation of vaginal immunity in pregnant women and this could explain why they are implicated in adverse pregnancy outcomes associated to bacterial vaginosis.

146

SERUM LEVELS OF SOLUBLE ADHESION MOLECULES IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Metelli M.R., *Bongioanni P., Fulceri F., Manzone F., Panicucci E., *Rossi B., Pietrini P.

Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Experimental Pathology, *Neurorehabilitation Unit, Department of Neuroscience, University of Pisa, Italy.

Immunological abnormalities have been implicated in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathogenesis. Adhesion molecules are markers of activated endothelial cells up-regulated by cytokines.

The aim of the present study has been done to evaluate the role of different endothelial adhesion molecules in ALS pathogenesis.

We assayed repeatedly over an one-year period intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), soluble E-selectin (sE-selectin) and soluble P-selectin (sP-selectin) in sera from 55 ALS patients (21 women and 24 men; mean age \pm SD: 63 \pm 12 years). According to the El Escorial criteria (1998), patients were divided into 3 groups: suspected (A), probable (B), and definite (C). Blood samples were drawn in the morning, and serum was stored immediately at -20° C. Adhesion molecules were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [R&D Systems].

Mean sE-selectin levels were significantly higher ($p < 0.001$) in group A and B vs group C patients (49.6 \pm 29.4 and 51.2 \pm 23.9 ng/ml vs 32.3 \pm 11.3 ng/ml). ICAM-1 levels were enhanced in all ALS patients. On the other hand, VCAM-1 and sP-selectin levels were mostly in the normal range and did not differ significantly among patients' groups.

Our data support, at least in part, a selective endothelial cell activation in ALS patients, which might play an important role in disease pathogenesis and/or pathophysiology.

Ikeda J., Kohryama T., et al. "Elevation of serum soluble E-selectin and antisulfoglucuronyl paragloboside antibodies in amyotrophic lateral sclerosis." Eur. J. Neurol. 2000 Sep; 7 (5):541-7

147**IONI E CRIOGLOBULINE: IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE E CLASSIFICATIVE**

De Simone A.¹, Romitelli F.¹, Baroni S.¹, Pucillo L.P.² e Di Stasio E.¹

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

²I.N.M.I. "L.Spallanzani" IRCCS Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - via Portuense 292 - 00149 - Roma

Le crioglobuline sono anticorpi patologici che precipitano reversibilmente a temperatura inferiore a 37° C associate a molteplici stati patologici di tipo neoplastico, infettivo ed autoimmune. I fenomeni che determinano l'aggregazione e la successiva precipitazione delle crioglobuline rimangono ancora oscuri anche se, recentemente, sono stati evidenziati effetti regolatori dipendenti da siti specifici per i cloruri ed è stata determinata una scala preferenziale di interazione anione-proteina in funzione dalla densità di carica degli stessi. Sporadicamente, erano stati osservati, in precedenza, fenomeni di precipitazione indotti da ioni positivi bivalenti, mentre nessuna azione sull'aggregazione era stata evidenziata da parte di ioni monovalenti. La modulazione ionica dell'aggregazione e successiva precipitazione di crioglobuline è stata analizzata tramite turbidimetria e successiva valutazione del criocrito. In un singolo paziente, in presenza di una componente monoclonale IgM associata a plasmocitoma, è stata evidenziata una conversione temporale dell'azione ione-specifica. In particolare, l'effetto inibitorio anionico presente all'esordio è successivamente scomparso mentre è subentrata un'azione pro-aggregante specifica da parte dei cationi. Infatti, concentrazioni pseudofisiologiche di Na⁺ e K⁺ attivano il processo di aggregazione conducendo rapidamente alla formazione del crioprecipitato mentre in presenza di cationi scarsamente reattivi con siti proteici a causa della loro densità di carica la cinetica di aggregazione è fortemente rallentata fino ad una totale dissoluzione del crioprecipitato. Tali osservazioni suggeriscono la possibilità che forze elettrostatiche possano drasticamente influenzare il processo di crioprecipitazione intervenendo nei fenomeni fisiopatologici alla base dello stesso. Inoltre la sensibilità all'azione di cationi ed anioni potrebbe introdurre una ulteriore modalità di classificazione delle crioglobuline potenzialmente utilizzabile per un miglior inquadramento diagnostico dei complessi quadri clinici associati a crioglobulinemia.

Di Stasio E., Bizzarri P., Casato M., Galtieri A., Fierily M. and Pucillo L.P. "Cl⁻ regulates cryoglobulin structure: a new hypothesis for the physiopathological mechanism of temperature non-dependent cryoprecipitation" *Clin Chem Lab Med.* (2004) 42(6): 614-20

148**VALUTAZIONE DI UN NUOVO MARKER FECALE, LA CALPROTECTINA, DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE CRONICHE INTESTINALI.**

Imbastaro T., Fazzi P., Russi C., Pistola F., Palmerini C., Marini A., Riario Sforza G.

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, P. O. "Spirito Santo" via Fonte Romana , 8 - 65124 Pescara .

Obiettivo

La calprotectina è una proteina presente nel citoplasma dei granulociti neutrofili e delle cellule epiteliali, con funzione di regolazione del processo infiammatorio. La calprotectina ha un peso molecolare di 36,5 kDa ed è costituita da due catene pesanti ed una catena leggera in grado di legarsi al calcio. La calprotectina viene rilasciata dai granulociti neutrofili attivati nei prodotti di secrezione ed escrezione corporei. Essa può essere determinata nelle feci. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di utilizzare, la calprotectina fecale quale marcatore di infiammazione intestinale. Abbiamo correlato la presenza della calprotectina, in pazienti con differenti patologie gastroenterologiche in modo da poter verificare la capacità di discriminare malattie infiammatorie organiche da malattie funzionali, come dolori addominali ricorrenti.

Materiali e Metodi

Sono stati studiati 12 pazienti in età pediatrica provenienti dal P.O. di Pescara in regime di ricovero o ambulatoriale. Di questi pazienti 4 presentavano Morbo di Crohn in fase attiva, 3 patologia funzionale e 5 altre patologie. Sono stati studiati altresì 4 pazienti adulti di età compresa tra i 40 e i 50 anni provenienti dal reparto di medicina.

Su ciascun campione di feci, per la ricerca della Calprotectina, abbiamo utilizzato un kit del commercio: Calprest (Eurospital S.p.A. Trieste) con i seguenti valori di riferimento:

Valore	Interpretazione
< 60 mg/kg di feci	Negativo
60-100 mg/kg di feci	Basso positivo o da ripetere
> 100 mg/kg di feci	Positivo

Risultati**Pazienti in età pediatrica**

Campione	Sesso	Calprotectin a mg/Kg feci	Note cliniche
1	M	102.5	Intervento per amartoma intestinale
2	M	371.2	Ematochezia persistente
3	M	510.55	Morbo di Crohn in fase attiva
4	M	843.55	Morbo di Crohn in fase attiva
5	M	10.71	Dolori addominali ricorrenti
6	F	50.32	Feci molto mucose

			diagnosi da definire
7	F	417.13	Morbo di Crohn in fase attiva
8	F	> 1250	Morbo di Crohn in fase attiva
9	F	89.84	Dolori addominali ricorrenti
10	F	43.22	Rettorragia
11	F	21.11	Dolori addominali ricorrenti e febbricola
12	F	5.47	Dolori addominali ricorrenti
13	F	18.75	Trapianto di organo addominale con diarrea ricorrente

Pazienti adulti

Campione	Sesso	Calprotectina mg/Kg feci	Note cliniche
1	M	1113.65	Rettocolite ulcerosa attiva
2	M	9.16	Angioma epatico, diarrea cronica accompagnata da dimagrimento
3	F	513.15	Rettorragia
4	F	> 250	Morbo di Crohn in fase di riacutizzazione

Conclusioni

A conferma di quanto riportato dalla più recente letteratura, anche la nostra breve esperienza, conferma che il livello di calprotectina fecale correla in maniera significativa con lo stato di attività della malattia nei pazienti con Rettocolite ulcerosa e Malattia di Crohn.

149

THE -511 C/T POLYMORPHISM OF THE INTERLEUKIN-1 BETA GENE IS ASSOCIATED WITH BACTERIAL VAGINOSIS.

Casabellata G.¹, Di Santolo M.¹, Guaschino S.², Cauci S.¹
¹Dept. Biomedical Sciences and Technologies, University of Udine, Udine; ²Dept. of Reproductive and Development Sciences, IRCCS Burlo Garofolo Hospital, University of Trieste, Trieste, Italy.

OBJECTIVE. IL-1beta is a cytokine produced by neutrophils, monocytes, macrophages, and epithelial cells in a variety of different infections in humans. Secretion of IL-1 beta leads to a proinflammatory cascade, including production of TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-2, recruitment and activation of neutrophils. Single nuclear polymorphism (SNP) in the promoter region of the IL-1B gene is associated with differential levels of cytokine expression and may influence the severity of the inflammatory response.

Bacterial vaginosis (BV) is the most common and recurrent disorder of the lower genital tract in women. BV is associated with preterm birth, low birth weight and increased susceptibility to sexual transmission of HIV infection. In vaginal fluid, BV provokes a large increase of IL-1beta, the master cytokine of proinflammatory vaginal response [1].

We investigated the role of -511 C/T polymorphism of the IL-1B gene in terms of the susceptibility to BV in Caucasian women (case-control study).

STUDY DESIGN. Vaginal fluid samples were obtained from 543 Italian women. The DNA extracted was analysed by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. BV was diagnosed according to Amsel criteria and Nugent score. Leukocytes count was evaluated on the Gram-stained smears.

RESULTS. 157 patients were positive for BV (28.9%). The genotype CC in the -511 IL-1B gene was correlated with BV (p:0.046; OR:1.462; C.I.:1.007-2.122). No significant association was observed for -511 genotypes and leukocytes mean count.

CONCLUSIONS. The observed association supports the hypothesis that genetic variation in IL-1B gene is involved in the aetiology of BV. In our study, the polymorphism in the promoter region of the IL-1beta does not influence the recruitment of leukocytes at vaginal level.

REFERENCE.

[1] Cauci S., Casabellata G., Di Santolo M., Driussi S., De Santo D., De Seta F., Guaschino S. (2004). Cytokines in Bacterial Vaginosis. International Proceeding *Cytokines in Cancer and Immunity*; San Juan Puerto Rico.

150**AUTOIMMUNOLOGIA: NUOVA ORGANIZZAZIONE DELLA ROUTINE CON L'INTRODUZIONE DELL' ENEASYSTEM III**

L. Rosa., P. Di Zenzo
Policlinico Militare di Roma, Dipartimento Diagnostica

Il ruolo del laboratorio di autoimmunologia è oggi considerato insostituibile nella diagnosi delle varie patologie autoimmuni e nel monitoraggio della terapia. Fino a pochi anni or sono la rilevazione degli autoanticorpi è stata esclusivamente qualitativa con metodologia IFI; solo di recente i tests EIA, disponibili su analizzatori automatici, hanno aumentato la loro presenza nelle routine di laboratorio, rivelandosi validi strumenti di supporto e, in molti casi, mezzi diagnostici alternativi alle metodiche tradizionali, affidabili sia per precisione analitica che per efficienza clinica. Nel nostro laboratorio l'introduzione del sistema automatico ENEASYSTEM III ha sicuramente portato ad una maggiore efficienza nell'organizzazione dei flussi di lavoro riducendo i tempi di risposta e l'operatività del personale applicato. Il sistema, già utilizzato per la diagnostica allergologica, è presente infatti da alcuni anni anche per l'esecuzione della routine di Autoimmunità in affiancamento alla metodologia IFI. L'ENEASYSTEM III è costituito da un analizzatore totalmente automatico che impiega una metodologia immunoenzimatica su fase solida con curve master memorizzate, legate al lotto reattivi. Lo strumento preleva i sieri da tubo primario, effettua le diluizioni, dispensa i reattivi, effettua i lavaggi e le letture fotometriche, il tutto mediante un braccio robotizzato gestito da un computer integrato nella strumentazione. L'utilizzo di protocolli analitici uniformi e la presenza di reattivi comuni consente di processare nella stessa seduta molti antigeni con determinazione contemporanea degli autoanticorpi di classe IgG, IgA e IgM. All'interno del nostro laboratorio il sistema ENEA viene utilizzato per il dosaggio degli ANA, degli ENA (screening e singoli), per la ricerca degli anticorpi anti Tg e anti TPO e per la determinazione delle immunoglobuline di classe IgG e IgM anti cardiolipina e B2GP1. L'esecuzione simultanea di tutti gli antigeni, con inserimento randomizzato delle analisi, ha permesso di ottimizzare e semplificare la nostra routine, consentendoci di fornire al clinico una risposta affidabile, completa per l'intero profilo analitico richiesto ed in tempi molto più rapidi. La rapidità di esecuzione dei tests, da 90 a 110 minuti per un totale di 150 determinazioni per 30 campioni, permette inoltre la programmazione di più sedute giornaliere in grado di soddisfare anche routine con carichi di lavoro molto elevati.

1. R. Tozzoli et al., Riv. Med. Lab-JLM, Vol.5, N1, 2004
2. C. Battista, 116° Corso CEFAR, La Thuile, 2001
3. R. Tozzoli, N. Bizzaro "La diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni sistemiche" – Piccin, 1998

151**SENSITIZATION TO HORSE ALLERGENS WITHOUT APPARENT EXPOSURE TO HORSE. REPORT OF TWO CASES.**

Cilento M.(1), Liccardi G.(2), Pepe M.G.(1), D'Amato G.(2), Dente B.(1)

(1) Laboratory of Clinical Pathology, "San Paolo" Hospital, Naples (Italy); (2) Department of Chest Diseases: Division of Pneumology and Allergology "A.Cardarelli" Hospital, Naples (Italy).

It has been well established that occupational exposure to horses increases the risk of allergic sensitization to horse hair, on the contrary very few data have been published in individuals without direct contact with horses.

We describe two cases of severe respiratory symptoms triggered by a single direct exposure in two patients with only 4-5 previous short contacts with horses during the entire their life, since they live in urban area of Naples.

Cutaneous and serological diagnostic tests showed significant sensitization to horse dander other than some common inhalant allergens. A blood sample was taken from both patients for the measurement of total IgE and specific IgE to the same allergens of the SPTs panel (CAP System FEIA, Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden)

Our report suggests that, in already (but unaware) horse-sensitized patients, the last direct contact with a horse has triggered severe respiratory symptoms.

Passive carriage of horse allergen by the clothes of individuals in contact with horses / horse environments or a cross-reactivity between horse allergen (a lipocalin) and the major allergens (also lipocalins) of several furred animals are likely to explain our findings.

Some other considerations can be derived by the clinical observation. First, it is likely that allergic sensitization to horse allergens could be more frequent than expected also in subjects without direct exposure to horse because of living in urban areas.

Secondly, individuals suspected to be highly atopic or those already sensitized to some pet dander should be tested by SPTs / radioallergosorbent test before the introduction of a pet indoors or, in the case of a big animal as the horse, a direct horse contact / entering into environments containing a horse.

Reference: Tutluoglu B, Atis S, Anakkaya AN, Altug E, Tosun GA, Yaman M. Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms. Clin Exp Allergy 2002;32:1170-73

152**RUOLO DEI MITOCONDRI E DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO NEL PROCESSO DI DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE DENDRITICHE UMANE DI ORIGINE MONOCITARIA**

Santoro G.*, Del Prete A.*, Di Paola M.°, Oliveros Celis C.#, Zaccagnino P.#, Lorusso M.°#

*Section of Clinical Biochemistry, University of Bari, °Institute of Biomembrane and Bioenergetics, CNR, Bari, #Department of Medical Biochemistry, University of Bari, Italy

Le cellule dendritiche (CD) sono una sottopopolazione di leucociti, altamente specializzata nella presentazione dell'antigene e nell'attivazione di risposte immunitarie T dipendenti. Le CD, che derivano da precursori midollari, si localizzano nei tessuti periferici dove svolgono il loro ruolo di sentinella aspettando l'arrivo di un eventuale antigene. Dopo la cattura dell'antigene, le DC iniziano un processo maturativo al termine del quale acquisiscono caratteristiche funzionali e fenotipiche differenti, che culminano nella migrazione dai tessuti periferici agli organi linfoidi secondari dove avviene la presentazione ai linfociti T "vergini", indispensabile per l'induzione di una corretta risposta immunitaria. Recenti studi attribuiscono un ruolo cruciale alle Specie Reattive dell'Ossigeno come secondi messaggeri che regolano la risposta delle CD a diversi stimoli fisiologici. E' stato descritto in letteratura come l'inibizione del trasporto di elettroni da parte della catena respiratoria mitocondriale possa indurre la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno. Sono stati riconosciuti due siti principali responsabili della produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno nella catena respiratoria, denominati rispettivamente Complesso I e Complesso III. Risultati preliminari ottenuti presso in nostro laboratorio dimostrano che: i) il processo di differenziamento delle CD a partire dai monociti circolanti è caratterizzato da un' incremento di circa tre volte della respirazione endogena ii) la presenza, nel mezzo di coltura, di dosi sub-ottimali di rotenone, inibitore del Complesso I della catena respiratoria, inibisce il processo di differenziamento di tali cellule. Infatti, le cellule trattate con rotenone presentano un incremento dei livelli di membrana del CD14, marcatore monocitario la cui espressione risulta drasticamente ridotta durante il processo di differenziamento a CD, e una riduzione del marcatore CD1a, tipico delle CD. Inoltre è stato osservato un aumento dell'espressione di membrana del CCR7, recettore chemiochinico responsabile della migrazione delle CD agli organi linfoidi secondari. Data la peculiare localizzazione delle DC all'interfaccia tra immunità adattiva e immunità innata, questo studio può permettere di identificare nuovi bersagli farmacologici nella regolazione delle funzioni delle CD.

153**ANTICORPI ANTI CITRULLINA ED AUTOANTICORPI CORRELATI**

Zabeo M., Rispoli F., Dolci A., Barberis M.

Dipartimento di Patologia, H Multimedita, via Fantoli 16/15, 20138 Milano

INTRODUZIONE: gli anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP) sono caratterizzati da una specificità del 97% e da una sensibilità dell'81% nei confronti dell'artrite reumatoide (AR). Presenti nel siero nelle fasi precoci della malattia, identificano una forma aggressiva caratterizzata da un'attività erosiva precoce. **SCOPO:** ricercare in pazienti AR+ il fattore reumatoide (RF) IgG, gli anticorpi anti-Nucleo (ANA), ENA, anti-Cardiolipina (aCL) IgG/IgM, anti- β_2 GPI IgG/IgM per determinare il quadro autoanticorpale associato alla presenza di anti-CCP per verificare l'eventuale predisposizione a sviluppare patologie autoimmuni correlate ad AR. **CAMPIONE:** 54 campioni di siero provenienti da soggetti AR+, clinicamente confermata, RF IgM positivi, di cui 37 anti-CCP+ e 17 anti-CCP-. I test sono stati inoltre eseguiti su 10 campioni provenienti da soggetti affetti da connettiviti non AR clinicamente confermate (LES, SS, sindrome da anti-fosfolipidi). **MATERIALI E METODI:** RF IgG ed IgM sono stati determinati per mezzo del Waaler Rose kit (BioMerieux) e del RF Latex Autom (Sentinel Ch), i test di autoimmunità sono stati eseguiti con kit diagnostici IFA ed ELISA (INOVA, Menarini). **RISULTATI:** la frequenza di positività per ANA, ad un titolo clinicamente significativo ($> 1:160$), è risultata superiore in soggetti AR+ anti-CCP+ che non in AR+ anti-CCP- (76% contro 36%, $p=0.005$). ANA in soggetti anti-CCP+ hanno mostrato un quadro fluoroscopico prevalente: Omogeneo con frequenza differente nei campioni AR+ anti-CCP+ (61%) rispetto ai campioni AR+ anti-CCP- (6%) ($p=0.002$). Tutti i campioni anti-CCP+ sono risultati ENA negativi. RF IgG in soggetti anti-CCP+ è presente a valori più elevati che non in soggetti anti-CCP- (265 ± 65 UI/mL vs 160 ± 35 UI/mL). aCL IgM ed anti- β_2 GPI, presenti a bassa frequenza e bassi titoli sia in soggetti anti-CCP+ che in anti-CCP-, non hanno mostrato differenze significative ($p=0.074$ e $p=0.28$). **CONCLUSIONI:** La principale differenza nel quadro autoanticorpale dei soggetti AR+ anti-CCP+ rispetto a quelli AR+ anti-CCP- consiste in ANA presenti con una frequenza maggiore, a titoli più elevati e con un quadro fluoroscopico predominante. I dati ottenuti non suggeriscono una maggiore predisposizione dei soggetti AR+ anti-CCP+ a sviluppare una specifica patologia del connettivo correlata ad AR, tuttavia la maggiore frequenza di ANA suggerisce un follow-up più frequente.

Van Venrooij WJ, Vossenaar ER, Zendman AJ. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2004 Jun;3 Suppl 1:S17-9

154

FILLERS AND COMPLEMENT SYSTEM

Ballerini S.*, Guarino M.D.**, Infantino M.*, Bernardini S.*, Fabri L.*, D'Amico L.*, Perricone R.** and Federici G.*

* Dept. of Medicine of Laboratory-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy

** Dept. of Internal Medicine-PTV, University of Rome Tor Vergata-Rome, Italy

Filler materials developed for the evolution of surgical techniques and new compounds have had a wide use in this time.

Filler materials for medical use present some problems of biocompatibility and tissue interaction.

The biocompatibility and the tissue interactions of the fillers utilized for plastic surgery have been investigated to enhance the role of these substances, the limits, and the inductions of chronic inflammation and fibrosis (1).

We decided to test the effect of some of this fillers utilized in plastic surgery on complement system.

We studied the CH50 of a pool of normal sera tested with these fillers to investigate the power of activation or inhibition of these fillers on complement cascade.

We have chosen a pool of 20 sera from healthy people and we have tested CH50 with results ongoing into normal ranges (143.15 U/ml) for age and sex.

Among the filler materials we have tested a mixture of non-animal stabilised hyaluronic acid 25 mg/ml and cross-linked hyaluronic acid 25 mg/ml, a protein extracted from the bacterium *Clostridium Botulinum*, a human collagen implant, the injection contains 35 mg/ml of collagen on phosphate tampon, a polyacrylamide hydrogel, a non-animal stabilised hyaluronic acid, a hyaluronic acid, a hyaluronic acid, a viscoelastic polyacrylamide gel and silicon.

The study indicated that the studied fillers do not interact with the complement system

1) E. Zarini *et al.* " Biocompatibility and tissue interactions of a new filler material for medical use" Plastic and reconstructive surgery, September 15,2004

155

A NEW APPROACH FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE DISEASES.

Bonaguri C., Russo A, Battistelli L., Aloe R., Caleffi A., Ferrari M., Marchesi L., Monica C.
Analysis Lab, Parma Hospital, Italy

Aim of the study. The constantly increasing request for serological autoimmunity tests makes a matter of some importance to evaluate new analytical systems, able to give both accuracy and flexibility to daily work. Furthermore the dosage of auto-antibodies available on the conventional ELISA kits uses the direct coating of auto-antigen on the microtiterplate: this technique can modify conformational parts of some proteins and prevents the availability of some epitopes for autoantibodies binding.

Methods. We have tested a new indirect enzyme immunoassay for the detection of a great variety of auto-antibodies in human sera. This system is characterized by use of common streptavidine-coated microtiterplate, liquid-biotinylated antigen and a multiparametric curve for different autoimmune markers (Bioone/Zentech-Alifax).

We determined anti-PR3 and anti-MPO antibodies levels of 67 sera samples already defined as regard the fluoroscopic pattern (c-ANCA, p-ANCA) on ethanol-fixed human granulocytes (IFA) (Zentech-Alifax). 39 sera samples were tested for anti-dsDNA both by ELISA test and by *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (Alphadia) (1).

Anti-dsDNA and anti-PR3 and anti-MPO antibodies have been tested: a) with a conventional ELISA systems using solid phase coated antigens (respectively Generic Assays-Alifax and Fenning BioMed); b) with a innovative Bioone ELISA system .

Results. A good correlation with the conventional ELISA systems was observed in this study. For dsDNA the Pearson's correlation coefficient (r), obtained comparing the different ELISA systems, was 0.80 with a positive/negative concordance rate of 76.9% (30/39). Considering the *Crithidia luciliae* immunofluorescence assay as reference-test, the positive/negative concordance rate was 79.5% for Generic Assays kit and 87.2% for Zentech kit.

The concordance positive/negative rate was 97.0% (65/67) for both anti-PR3 and anti-MPO antibodies.

Conclusions. This study pointed out a good performance of the Bioone ELISA system. The good correlation with IFA test observed for Zentech kit is likely due to the use of liquid biotinylated antigens whose conformational structure is totally respected and all epitope sites are available for the binding. It is also interesting to note that the use of common microtiterplate, coated by streptavidine, provide to Bioone kit a possibility to carry out in a routine methodology an analysis of the non-specific-binding with the support and, consequently, avoid to give false-positive

References. 1) Egner W. " The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE "J. Clin. Pathol., 53, 424-432,2000.

156

CALPROTECTINA FECALE NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI NEL BAMBINO

Ballerini S.*, Infantino M.*, Bernardini S.*, Iori R.*, Bellincampi L.*, Valentini A.*, Rapanotti R.*, Paone F.M.***, Corsetti T.**, Minò G.** and Federici G.*

*Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma.

**Dip. Gastroenterologia pediatrica, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma

La malattia di Chron (MC) e la colite ulcerosa (CU) sono malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI) la cui eziologia è tuttora ignota. Il 20% del totale delle MICI sono pazienti in età pediatrica. Lo spettro clinico delle MICI è estremamente variabile ponendo spesso problemi di diagnosi differenziale soprattutto con la sindrome dell'intestino irritabile (SII). Il dosaggio nelle feci dei principali markers biologici di flogosi appare il test ideale per la valutazione di un'eventuale coinvolgimento della mucosa intestinale. Recentemente nei pazienti con MICI è stata dimostrata una stretta correlazione positiva tra il dosaggio della calprotectina fecale, una proteina presente in grande quantità nei granulociti neutrofili, e l'escrezione nelle feci di granulociti marcati con ¹¹¹In.

Obiettivo: L'obiettivo è stato quello di valutare l'utilizzo del dosaggio della calprotectina fecale come marker non invasivo di attività dello stato infiammatorio nelle MICI del bambino alla diagnosi e nel follow-up.

Metodologie: 35 pazienti affetti da MICI (25 diagnosticati istologicamente di cui 11 MC, 10 CU, 4 Coliti indeterminate e 10 in attesa di esame endoscopico), 22 intolleranze al lattosio, 23 affetti da SII, provenienti dal Dipartimento di Gastroenterologia pediatrica del Policlinico di Tor Vergata, sono stati sottoposti a valutazione clinica e al dosaggio della calprotectina fecale. I livelli di calprotectina fecale sono stati valutati impiegando un test ELISA quantitativo (Calprest, Eurospital, Trieste, Italia) ed espressi come µg/g di feci (valore normale < 50 µg/g).

Conclusioni: Valori di calprotectina aumentati sono stati osservati nei pazienti con MC, CU, e con colite indeterminata, mentre pazienti con SII hanno mostrato valori compresi nel range della normalità. Le differenze sono risultate statisticamente significative (p<0,0001).

1) Rammes *et al.* J. Biol. Chem. 1997, 72: 9496-02.

157

CORONARY MONOCYTE-PLATELET ADHESION INDEX AFTER EXTRACORPOREAL CIRCULATION AND REPERFUSION.

Buffa M.,¹ Parri MS.,¹ Spiller D.,¹ Bevilacqua S.,² De Filippis R.,¹ Sbrana S.,¹ Gianetti J.,¹ Clerico A.¹

¹Laboratory of Flow Cytometry, CNR Institute of Clinical Physiology, "G.Pasquinucci" Hospital, 54100 Massa. ²Cardiac Surgery Department, CNR Institute of Clinical Physiology, "G.Pasquinucci" Hospital, 54100 Massa.

Background and aim: Mononuclear cell functional changes represent a hallmark of inflammation during cardiopulmonary bypass (CPB) and cardiovascular surgery. In particular, leukocyte-platelet interaction is an important mechanism underlying monocyte functional modulation (1). We used flow cytometric procedures in order to derive a normalized adhesion index, related to the interaction between circulating monocytes and platelets, independently of numerical variations of involved cells.

Methods: Samples of 13 patients undergoing cardiac operation were drawn from venous coronary sinus before cardioplegia and after reperfusion. The following parameters were studied: monocyte surface molecules (CD15s, CD162) mediating the binding with platelet selectins, monocyte-platelet conjugates (using antibodies against CD45, CD14, CD41a), platelet activation markers (CD62P, PAC-1). The capacity of monocytes and platelets to coaggregate (adhesion index) was calculated according to the following formula: adhesion index = [%] x [n° of monocytes/µl] x [T] / [n° of platelets/µl], where [%] is the percentage of conjugates calculated by flow cytometry, and [T] represents the time of cardioplegia. Normalization for T value, carried out on blood samples obtained after cardioplegia, is used to attenuate the trapping effect of the CPB apparatus on circulating monocyte-platelet conjugates.

Results: An increase of adhesion index (from 0.048 ± 0.012 to 0.079 ± 0.012) was observed at reperfusion, although not statistically significant (P = 0.062). No significant variations of monocyte markers CD15s and CD162, as percentage (from 92.36 ± 2.20 to 91.25 ± 2.28, and from 99.97 ± 0.02 to 99.98 ± 0.01) or relative fluorescence intensity (RFI) (from 355.00 ± 42.20 to 329.70 ± 30.70, and from 590.41 ± 2.63 to 589.45 ± 4.82) were observed at reperfusion. No significant variations in platelet molecules CD62P and PAC-1, as percentage (from 8.52 ± 3.58 to 9.01 ± 3.30, and from 60.56 ± 1.95 to 59.25 ± 2.60) or RFI (from 148.00 ± 6.16 to 140.15 ± 5.29, and from 147.76 ± 5.49 to 146.53 ± 4.25) existed at reperfusion.

Conclusions: These data suggest that the increased normalized adhesion index between monocytes and platelets, without receptor variations, might reflect proadhesive monocyte membrane modifications induced by CPB and coronary reperfusion.

(1) Clin Exp Pharmacol Physiol 2001; 28: 804-808.

158**EVIDENCE OF CARDIAC DYSFUNCTION IN SYSTEMIC SCLEROSIS.**

Lippi G.¹, Caramaschi P.², Montagnana M.¹, Salvagno G.L.¹, Volpe A.², Guidi G.C.¹.

(1) Ist. di Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Osp. Policlinico, P.le Scuro 10, 37121 Verona, ITALY; (2) Dip. Medicina Clinica, Sez. Medicina Interna B, Verona, ITALY.

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disorder of the connective tissue, characterized by widespread vascular lesions, fibrosis and vascular occlusive complications. Although a large vessels and myocardial ischemic involvement is not a hallmark of SSc, it may be more common than suspected. Therefore, to evaluate the effective cardiac involvement of SSc patients, we analyzed an early indicator of myocardial ischemia (Ischemia Modified Albumin, IMA), a late specific marker of myocardial damage (cardiac Troponin T, cTnT) and a prognostic marker of cardiac dysfunction (pro-Beta Natriuretic Peptide, proBNP) in thirty consecutive female SSc patients (mean age 47.2 years, mean disease duration 8 years, 16 with limited and 14 with diffuse disease patterns), fulfilling the American Rheumatism Association's criteria for the diagnosis of SSc. Forty control subjects, matched for age and sex, were also recruited among healthy hospital personnel. Blood was collected in the morning on fasted subjects, who gave an informed consent for being tested. After centrifugation at 1500g for 10 min at room temperature, heparinized plasma was separated, stored in aliquots and kept frozen at -70° C until measurement. cTnT and proBNP were assayed on the Elecsys 2010 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), whereas IMA was determined by a colorimetric assay (ACB, Ischemia Technologies, Denver, USA) on the Modular System P (Roche Diagnostics GmbH). Main results are synthesized in table 1; values are expressed as median and 2.5%-97.5% distribution. Although the concentration of cTnT was always lower than the detection limit of the assay in both patients and controls, proBNP and IMA values were substantially higher in SSc patients. Additionally, the percentage of subjects displaying values exceeding the conventional thresholds for proBNP (>14.8 pmol/l) and IMA (>100 Kunits/l) was also significantly different between SSc patients and controls (proBNP: 24% vs 5%, p<0.001; IMA: 79% vs 24%, p<0.001). Taken together, these results indicate that SSc patients might suffer from a chronic and generalized ischemic condition, as reflected by raised IMA values. Additionally, we provide evidence that SSc might also involve the cardiac muscle, as attested by increased plasma proBNP values. Owing to the non-diagnostic cTnT concentration, fibrosis is the most likely cause of myocardial dysfunction.

Reference: Chandalia MS, Vanjani CV, Bhagwat AR, et al. Cardiac involvement in systemic sclerosis. J Assoc Physicians India 1993; 41:631-2.

	Controls	SSc patients	P
N.	40	30	
cTnT (ng/ml)	<0.01	<0.01	n.s.
IMA (Kunits/l)	90 (81-114)	106 (90-141)	<0.001
Pro-BNP (pmol/l)	4.7 (1.7-15.8)	10.5 (3.1-37.4)	<0.001

159**FALSE POSITIVE RESULTS WITH SECOND-GENERATION ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE (CCP) ANTIBODY ASSAYS**

Ghignone R., Frezet D., Bedogni S., Paoli D., Betteto S., Becattini M., Mengozzi G., Pagni R.

Laboratorio Chimica Clinica "Baldi e Riberi", A.S.O. San Giovanni Battista, Torino.

A multicentre protocol was developed to answer some doubts expressed by clinicians on the occurrence of anti-ccp positive results both in non-rheumatoid arthritis patients and in healthy subjects. The study was therefore aimed at evaluating the diagnostic specificity of anti-ccp results in a series of 583 samples, including 163 patients with an established diagnosis of rheumatoid arthritis (ra) (101 females, mean age 54.2 years, range 17-78), 256 diseased controls (124 females, mean age 51.8, 16-82), among them 59 had sle, 28 sjogren syndrome, 12 ssp, 11 psoriatic arthritis, 37 undifferentiated arthritis, 10 mixed connective tissue disease, 7 vasculitis, 20 hcv-related arthropathy, 47 myelodysplastic syndromes and 15 other autoimmune disorders), as well as 164 apparently healthy controls (89 females, mean age 49.5, 21-73), including blood donors and family members (n=45) of affected patients. anti-ccp levels were assessed using three second-generation assays: diastattm, axis shield diagnostics, dundee, uk; elia ccp pharmacia diagnostics, frieburg, germany; and euro-diagnostica ab, malmö, sweden. roc curve analysis yielded 97.6%, 98.4% and 98.2% specificity with diastat, elia, and eurodiagnostica, respectively. apart from ra group, high-titer anti-ccp values were detected with all three assays in 1 patients with sle, two with sjogren syndrome, one with hcv-related crioglobulinemia, two with scleroderma, as well as in a son of a ra patient. on the other hand, the need of increasing threshold limits to include those subjects with anti-ccp concentrations in the low range of positivity (22 out of 420 controls, 5.2%) may support the hypothesis that supposedly false positive results could predict an early phase of rheumatoid arthritis development¹. these borderline anti-ccp values should be considered of uncertain clinical significance. although our data confirmed the high diagnostic performances of second-generation anti-ccp tests, possible implications of deamidation pathway should be investigated to explain the occurrence of moderate-to-high positive results under conditions other than ra.

¹van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes RE, Huizinga TW. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. Arthritis Rheum. 2004 Mar; 50: 709-15.

160

DOSAGGIO QUANTITATIVO DELLA
PROCALCITONINA NELLA RISPOSTA DI TIPO
ALLERGICO.

Altamura S.*, Caruso M.***, Ladogana P.*, Di Martino F.***, Scognamiglio E.***, Bruno C.***, Postiglione L.*, Covelli B.*, Ricciardone M.*, Buonavolontà L.*, Conti A.*.

*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano". Università degli Studi di Napoli "Federico II" Fac. Medicina e Chirurgia. **ASL NA1 P.O.SS. Annunziata.

La Procalcitonina (PCT) è il pro-ormone della calcitonina ed è ben nota l'induzione di questo peptide in corso di infezioni batteriche disseminate. E' prodotta abitualmente dalle cellule C della tiroide e nell'individuo sano non ha un ruolo fisiologico riconosciuto, per contro, in caso di infiammazione sistemica la PCT sembra giocare un ruolo fisiopatologico importante, infatti essa figura attualmente tra i migliori marcatori biologici delle infezioni di origine batterica, fungina o parassitaria¹. Numerose e recenti pubblicazioni hanno dimostrato l'utilità del dosaggio della PCT nella diagnostica differenziale della sindrome da risposta infiammatoria sistemica. La PCT tuttavia può presentare possibile elevazione in condizioni non infettive, caratterizzate da livelli particolarmente elevati di citochine proinfiammatorie.

Il nostro studio si è proposto di valutare i livelli della PCT nelle reazioni allergiche, nelle quali è noto che si sovrappone un processo di tipo infiammatorio.

Abbiamo dunque correlato i valori della PCT con i valori delle IgE totali ottenuti testando il siero di 100 soggetti adulti con diagnosi di sospetta allergia pervenuti nei nostri centri.

Le IgE totali sono state dosate con una tecnica di 3° generazione in chemiluminescenza amplificata Immulite (Immulite 2000- DPC, Los Angeles, USA), per le determinazioni quantitative della PCT sono stati eseguiti dosaggi immunoluminometrici (Lumitest-Dasit, Milano, Italia).

I risultati sperimentali ottenuti, relativi ai dosaggi dei due parametri su citati, indicano che per quei soggetti (n=70) i cui i valori delle IgE totali si trovavano nel range fra 300 e 600 KU/l (v.n. <110 KU/l), si sono riscontrati concentrazioni di PCT compresi tra 1,2 e 3 ng/ml (v.n. <0,5 ng/ml), mentre nei soggetti con valori di IgE totali che si trovavano nel range fra 100 e 110 KU/l, i valori di PCT erano <0,5 ng/ml.

I risultati derivati da questo studio preliminare sembrano dimostrare, come precedentemente descritto in letteratura, che la Procalcitonina può essere leggermente elevata in condizioni non necessariamente correlate ad infezioni e che la sua induzione *in vivo* è stimolata da fattori diversi dalle endotossine batteriche, quali le citochine proinfiammatorie, queste ultime sono notoriamente coinvolte nei meccanismi patogenetici delle reazioni allergiche.

¹ Nijsten et al. Crit Care Med 2000; 28:458-61.

161

VALUTAZIONE DEI LIVELLI SIERICI DELLE
LDL OSSIDATE E DEGLI ANTICORPI ANTI LDL
OSSIDATE NELLA CIRROSI EPATICA

Pittoni M.¹, Angeli P.², Celadin M.¹, Venturini R.¹, Fasolato S.², Sticca A.², Plebani M.¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, ²Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Padova

Scopo del Lavoro. Le LDL ossidate (LDLox) e gli anticorpi anti LDL ossidate (Ab anti oxLDL) sono stati proposti come marker di stress ossidativo. L'ossidazione delle LDL è inibita nelle condizioni cliniche caratterizzate da iperproduzione di NO. La cirrosi epatica con ascite è una condizione clinica caratterizzata da stress ossidativo, ma anche da una cronica iperproduzione di ossido nitrico (NO). Lo scopo dello studio è stato quindi quello di valutare i livelli sierici di LDL ossidate e di anticorpi anti-LDLox nella cirrosi con ascite.

Materiali e metodi. In un gruppo di 23 pazienti con cirrosi epatica in scompenso ascitico e 10 soggetti di controllo sono stati dosati: LDLox (MERCODIA Oxidized LDL ELISA, Test Medical, Bologna), Anticorpi anti-LDLox (Anti oxLDL IgG/IgM, IMTEC, ALFA WASSERMANN, Milano), NO (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay kit (LDH Method), Cayman, Ann Arbor, MI). Sugli stessi campioni sono stati dosati anche Albumina, Colesterolo, LDL Colesterolo (MODULAR DP, Roche Diagnostics, Milano)

Risultati. Nei pazienti cirrotici con ascite sono stati riscontrati livelli sierici di LDLox significativamente ridotti rispetto ai controlli (24.39 ± 3.82 vs 41.08 ± 2.19 U/L, $p < 0.01$). I livelli sierici di NO sono più elevati nei cirrotici rispetto ai controlli (101.33 ± 18.50 vs 21.21 ± 1.70 μ M/L, $p < 0.025$). I livelli sierici di Ab anti oxLDL sono risultati più elevati nei pazienti cirrotici (57.84 ± 7.93 vs 26.13 ± 3.07 U/mL, $p < 0.025$). Una correlazione diretta è stata osservata tra LDL Colesterolo e LDLox ($r = 0.46$, $p < 0.01$). Una correlazione inversa è stata osservata tra livelli di LDLox e livelli di NO ($r = -0.45$, $p < 0.025$).

Discussione e conclusioni. La riduzione dei livelli di LDLox in corso di cirrosi con ascite è legata in primo luogo alla riduzione della sintesi epatica di LDL. Tuttavia, il riscontro di una correlazione inversa tra LDLox ed NO consente di ipotizzare anche una ridotta ossidazione delle LDL. Ne deriva che vi sono buone ragioni per non impiegare le LDLox come marker dello stress ossidativo nella cirrosi con ascite. Per contro i livelli degli Ab anti oxLDL sono risultati significativamente aumentati in corso di cirrosi. Tale riscontro può anche essere considerato solo un epifenomeno dell'incremento delle gamma-globuline che si riscontra abitualmente nei pazienti con cirrosi, legato, almeno in parte, alla apertura di shunt porto-sistemici. Tuttavia, si può anche ipotizzare che l'ossidazione delle LDL in corso di cirrosi, benché limitata, non ne riduca il potere immunogeno.

-Bomzon A., Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. Pharm & Therap 89: 295-308, 2001.

162**VALUTAZIONE DELLA VARIABILITA' DELL'AGA E DELLA tTG IN CORSO DI ROUTINE CON ENEASYSTEM III.**

Serafini S., Malfagia G., Lucchini E.R.
Azienda USL Roma H, P.O. G. CARTONI – Rocca Priora (RM)

Il sistema ENEA è presente nel nostro Laboratorio per l'automazione delle linee Autoimmunità, ToRCH e per i tests AGA e tTG per la diagnosi del Morbo Celiaco. Nella nostra esperienza l'introduzione di un test sierologico per la ricerca di ab anti AGA e anti tTG ha portato significativi vantaggi rispetto ad altre metodologie tra i quali un minor utilizzo delle tecniche invasive come la biopsia intestinale che comunque rimane il "Gold Standard" di conferma. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le performance analitiche dei test anti AGA e anti tTG della linea automatizzata ENEASYSTEM III, nonché valutare l'integrazione del sistema nell'organizzazione della routine di lavoro nel nostro settore di laboratorio. Peculiarità del sistema è infatti quella di poter eseguire nella stessa sessione di lavoro differenti parametri analitici (fino ad un massimo di 19 diversi antigeni in simultanea) con ottimizzazione delle sedute di lavoro. Il sistema per la linea Autoimmunità e Celiachia è infatti in grado di processare, in totale automazione, 30 campioni per 150 tests a seduta, utilizza provette primarie con identificazione bar Code e diluizione automatica dei sieri. I tempi di esecuzione sono estremamente ridotti (da 90 a 105 minuti) ed il software gestionale di facile approccio. La metodologia applicata è ELISA a temperatura controllata con curve Master (legate al lotto reattivi) con ricalibrazione a 2 punti ogni 15 gg. Gli antigeni impiegati sono di origine estrattiva o ricombinante, come per la tTG per la quale si utilizza transglutaminasi umana, e sono adesi ad un supporto in fase solida, l'ACE, ad alta capacità legante. Per la valutazione della precisione analitica abbiamo preso in considerazione i risultati ottenuti dal programma di CdQ interno della Bioallergy basato sull'utilizzo di sieri di controllo a titolo noto specifici per antigene. I sieri di controllo vengono caricati in linea con la seduta campione ed i risultati archiviati nel modulo dedicato. L'analisi statistica dei dati viene effettuata in base al lotto ed i risultati elaborati automaticamente nel grafico di Levey-Jennings, che riporta la distribuzione temporale con il valore medio e la deviazione standard, e nella carta di Westgard con le relative classi di errori rispetto al valore atteso. I coefficienti di variazione ottenuti mostrano un elevato livello di precisione per entrambi i tests AGA e tTG; la possibilità inoltre di poterli eseguire in simultanea ai tests di Autoimmunità permette una ottimizzazione della sedute di lavoro con riduzione del personale e del tempo dedicato.

CV inter-assay			
AGA IgG 9.6 %	AGA IgA 8.8 %	tTG IgG 9.1 %	tTG IgA 8.5 %

163**APS: ROLE OF THE ANTIBODIES ANTIPHOSPHOLIPIDES AND OF THE COFATTORIS**

Esposito S., Faricelli R., Rabottini S., Troiano S., Filippi G., Quaranta M., Flacco M., Martinotti S.
Laboratory of Clinical Pathology II - Ospedale Clinicizzato SS Annunziata - Chieti - Italy

Objective some job is the increase of the diagnostic iter of the APS to the light of the tendency of the clinicians to associate to the APS clinical manifestation different from those classical, thanks to the actual availability of new immunoenzymatic assay for the measurement of the levels of antibodies antiphospholipides and of protein anticofattoris.

They have been considered 700 patients with suspect of APS, 518 females (74%) and 182 males (26%). The age media±DS is of 35±10 (range 11-92).

The protocol of investigation includes the following antibodies tested in ELISA: antiphospholipides, anticardiolipin, anti-β₂GPI, antiprothrombin, antiphosphatidilserin, antiphosphatidilinositol and anti-acid phosphatidic, LAC.

Effectuated the antibodies dosing is observed that:

12 patients they showed positiveness for aCL and a-β₂GPI and they resulted therefore sick of APS;

15 patients with middle-tall positiveness of aCL but negative to a-β₂GPI have been submitted to a further diagnostic deepening that has furnished the followings results:

2 positive for **anticardiolipina, antiprotrombina, antifosfatidilserina and antifosfatidilinositolo** correlated respectively to venous and arterial thrombosis, cerebropatie and polyabortivity;

1 positive for **antifosfatidilserina**;

1 positive for **antifosfatidilinositolo**;

1 positive for antibodies **antifosfatidilserina and antifosfatidilinositolo**;

10 positive only for antibodies **anticardiolipina**.

2 patients investigated for polyabortivity and infertility, affected from APS, also results positive for the annexin V.

From the gotten results it is deduced that the tests of screening have to consider exhaustive when, in presence of autoantibodies anticardiolipina, the antibodies are determined a-β₂GPI. In absence of these last it is useful the determination of all the other antibodies.

Then the presence of antibodies relatives in APS represents a factor of risk for the venous and arterial thrombosis and for all those pathologies the antibodies are in partnership, also in the patient asintomaticis.

164

MATRIX METALLOPROTEINASE-9 IN SERUM OF PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Metelli M.R., *Bongioanni P., Manzone F., Fulceri F., Puccetti C., Panicucci E., * Rossi B., Pietrini P.
Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Experimental Pathology, *Neurorehabilitation Unit, Department of Neuroscience, University of Pisa, Italy.

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is a member of the family of zinc-dependent endopeptidases that degrade extracellular matrix proteins. Elevated levels of MMP-9 have been reported as marker for peripheral nerve and muscle injury, suggesting a role of MMP-9 in neurodegeneration.

To verify such a hypothesis in motor neuron disease, in the present study we assayed MMP-9 in sera from 55 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients (21 women and 24 men; mean age \pm SD: 63 ± 12 years).

According to the El Escorial criteria (1998), patients were divided into 3 groups: suspected (A), probable (B), and definite (C). MMP-9 levels were determined repeatedly over an one-year period. Blood samples were drawn in the morning, and serum was stored immediately at -20° C. MMP-9 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [R&D Systems].

Serum MMP-9 levels increased in ALS patients and remained elevated during long-term follow-up. In clinically definite ALS patients MMP-9 levels were lower than in suspected ones, although not significantly (group A vs group C: 596 ± 485 ng/ml vs 524 ± 396 ng/ml, t test value = 0.839, p = 0.403).

Our findings of elevated levels of MMP-9 in sera from ALS patients might be caused by up-regulation of MMP-9 in degenerating peripheral nerves following motor neuron loss.

Demestre M., Parkin-Smith G., et al. "The pro and active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis." J. Neuroimmunol.

2005 Feb;159(1-2):146-54

165

EFFECTS OF HOMOCYSTEINE EXPOSURE ON DNA DAMAGE IN CULTURED HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES.

Picerno I.², Chirico C.², Caccamo D.¹, Condello S.¹, Visalli G.², Ferlazzo N.¹, P. Spataro², R. Ientile¹
Departments of ¹Biochemical, Physiological and Nutritional Sciences and ²Hygiene and Public Health, University of Messina, Italy.

Elevated levels of total homocysteine (tHcy) correlate with increased risk for pathological conditions involved in cardiovascular as well as cerebrovascular diseases (1). Despite the potential importance of numerous observations on the damage to vascular endothelial cells (2, 3), underlying molecular mechanisms of Hcy effects are not yet understood.

Human peripheral blood lymphocytes have been extensively used to evaluate the involvement of oxidative stress in different pathological conditions. In the present study, we examined the effects of Hcy exposure on genetic damage and proliferation of mitogen-activated human peripheral blood lymphocytes (HPBL) *in vitro*.

For this study, HPBL were cultured in 10% fetal calf serum (FCS) RPMI at initial density of 10^6 cells/ml and in presence of ConA (5 μ g/ml). Cytochalasin B (5 μ M) was added 44 h later. In a subset of experiments IL-2 (100 UI/ml) was added at 24h and 36h from culture. Cytokinesis-block micronucleus method and COMET assay were used for evaluation of DNA damage.

Cytotoxicity studies indicated differences between cultures of ConA-stimulated lymphocytes with respect to cell viability. Hcy (1 mM) significantly reduced the number of viable cells. Under our experimental conditions, Hcy significantly induced DNA damage in HPBL. In addition, we observed a correlation between the micronucleus frequency in ConA-stimulated lymphocytes and Hcy incubation.

Considering that changes in ConA response seen in Hcy-cultured HPBL can be related to alterations in cell cycle caused by Hcy exposure, we examined the genotoxic effects of Hcy (1mM) in presence or absence of IL-2 added exogenously to ConA cultures. The addition of IL-2 (100 UI/ml) in 24h ConA cultured HPBL reduced micronucleus frequency after cytokinesis-block in Hcy-exposed cells. On the contrary no restorative effects were observed when IL-2 was added after 36h from Hcy exposure. These results have confirmed that Hcy exposure promoted a DNA damage in cultured HPBL. The observed effect of IL-2 suggested that *in vitro* impairment of functional status of HPBL can be related to alterations of the maturation promoting factors involved in cell-cycle regulation.

1. Miller JW, (1999) Nutr.Rev. 57, 126-129.
2. Faraci FM., Lentz SR (2004) Stroke 35, 345-347.
3. Kathy KW et al. (2004) Circ. Res. 94, 28-36.

166

THE DEGREE OF SEROLOGICAL SENSITIZATION TO CAT ALLERGEN IN PATIENTS WITH OR WITHOUT CAT AT HOME (preliminary data).

Dente B.(1), Caruso B.(4), Cilento M.(1), Liccardi G.(3), Mazzarello M.G.(2), Perfumo M.(2), Pepe M.G.(1), Senna G.(5), Staffa C.(6), D'Amato G.(3)

(1) Laboratory of Clinical Pathology, "San Paolo" Hospital, Naples (Italy); (2) Laboratory of Clinical Pathology, Ovada Alessandria (Italy); (3) Department of Chest Diseases: Division of Pneumology and Allergology "A.Cardarelli" Hospital, Naples (Italy); (4) Laboratory of Clinical Pathology and Haematology, Verona General Hospital, Verona (Italy); (5) Allergy Service, Verona General Hospital, Verona (Italy); (6) Clinical Pathologist Consultant.

□ **Background:** The relationship between exposure to cat / dog in domestic environments and development of allergic sensitization to pet allergens is still controversial.

□ **Objective:** To test the role of indirect exposure to cat, we aimed to evaluate the amounts of cat specific IgE in sensitized subjects with or without cat at home.

□ **Methods:** Three hundred six adult patients with a previous diagnosis of allergic sensitization to cat allergens (by skin prick test) were enrolled for this study.

Among 306 men and women sensitized to cat (and other allergens), 150 owned a cat for at least 10 years (direct exposure) and 156 had never owned this animal (indirect exposure). An internal questionnaire specifically designed for the study was completed by the same allergists during the screening consultation: the results of skin prick tests, personal and clinical data, periods of symptoms and characteristics of cat ownership were carefully recorded. Specific IgE to cat extract was determined by the Pharmacia CAP System FEIA (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden) and Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA)

□ **Results:** Although specific IgE to cat allergen were significantly higher in patients with cat at home ($F=42,77$; $p< 0.001$), high amounts of these antibodies were found also in sera of subjects indirectly exposed to cats.

□ **Discussion:** The results of our study demonstrate that the degree of serological sensitization to cat allergens may be relevant also in subjects without any direct contact with cats (indirect exposure).

Reference: Bollinger M.-E., Eggleston P.-A., Flanagan E., Wood P.-A. - Cat antigen in homes with or without cats may induce allergic symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:907-14.

167

VALUTAZIONE COMPARATIVA TRA IL TITOLO ANTICORPALE PER IL TEST ANA E LA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI-ENA.

Castiglione C., Ciantra G., Mascitelli M., Palmucci Z., Tresca E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P.O. "S. Massimo" Penne (PE),

Introduzione. Sempre più numerose, in questi ultimi anni, sono le richieste per la rilevazione di anticorpi anti nucleo in pazienti con sintomi clinici sospetti per MAIS. Spesso però, come prima indagine in questo sospetto diagnostico, viene richiesta anche la determinazioni di autoanticorpi anti ENA.

Scopo di questo studio è quello di valutare l'adeguatezza delle richieste afferenti al nostro Laboratorio nel periodo aprile 2004-giugno 2005 nei pazienti alla prima indagine nel sospetto diagnostico di MAIS.

Materiali e metodi.

Sono stati analizzati 550 sieri di pazienti pervenuti con richiesta congiunta di ANA ed ENA. La ricerca degli anticorpi anti nucleo è stata eseguita con metodica IFI su Hep-2 (BIORAD) mentre quella degli autoanticorpi anti ENA con metodica EIA (DIAMEDIX) ENA6-screen.

Risultati.

TOTALE DETERMINAZIONI 550	
N°40 ANA pos. 1:80 ENA neg.	N° 16 ANA pos.1:160 10 ENA pos. 6 ENA neg.
N°4 ANA pos. 1:320 ENA pos.	N° 4 ANA pos. 1:640 ENA pos.
N° 486 ANA negativi	

In un solo paziente ANA neg. è stata evidenziata una positività border-line per gli anticorpi anti ENA (0,18%), mentre nei 40 paz.pos. con titolo 1:80, la ricerca degli anticorpi anti ENA ha dato sempre esito negativo.

Conclusioni.

I risultati ottenuti confermano che titoli ANA inferiori ad 1:160, in assenza di sintomi specifici, non devono indurre ad ulteriori approfondimenti diagnostici, quanto invece a monitoraggio nel tempo.

Bibliografia.

Vaile JH, Dyke L, Kherani R, Johnston C, Higgins T et al.

Is High titre ANA specific for connective tissue disease? *Clin. Exp. Rheumatol* 2000;18:433-8

168

COMPARISON OF IMMUNOFLUORESCENCE ASSAYS FOR EVALUATION OF ASMA, LKM, AMA AND PCA AUTOANTIBODIES.

Porcelli B. *, Pagani R. *, Petralia S. #, Vittoria R. #, Salvi M. #, Martini S. #, Terzuoli L. *

*Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Sezione di Biochimica, Università degli Studi di Siena

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese

Aim: Autoantibodies are immunoglobulins that react against host antigens and may or not be disease specific. Anti-smooth muscle antibodies (ASMA), anti-liver kidney microsome antibodies (LKM), anti-mitochondrial antibodies (AMA) are a characteristic finding in autoimmune liver disease. Antibodies to gastric parietal cells (PCA) are a hallmark of gastric autoimmune disorders. The basic technique for the routine testing of these autoantibodies is indirect immunofluorescence (IIF) on a rat multi-organ substrate panel that include kidney, liver and stomach (Vergani D. *et al*). This allows for detection of ASMA, LKM, AMA, and also liver cytosol type 1 (anti-LC1) and anti-nuclear (ANA). The aim of this study was to estimate indirect immunofluorescence assays for their evaluation in order to facilitate the analysis of autoantibodies which we test for routinely: ASMA, LKM, AMA and PCA.

Methods: Three assays with rat liver/kidney/stomach substrate:

- 1) Fluoro-kit Test Systems, 60 determinations, 6 well substrate slides (from DiaSorin);
- 2) COMVI III, 48 determinations, 8 well substrate slides (from IMMCO Diagnostics);
- 3) Mosaic basic Profile 13B, 100 determinations, 10 fields (from Euroimmun)

were evaluated in terms of analytical performances and sensitivity in twenty subjects. The starting serum dilution was 1/80. For sera positive, dilution of 1/160, 1/320, 1/640 were executed.

Results: Analytical performance was satisfactory with all three assays; assay 1 and 2 are similar, with three large tissue sections for each slides, easily examinable; assay 3 shows a very good system for application test sera. Sensitivity was higher in assay 1 and 2 for ASMA and PCA, higher in assay 3 for AMA, similar in assay 1, 2, 3 for LKM.

Conclusions: Our results indicate that the tests analysed are valid for routine laboratory determination of ASMA, LKM, AMA and PCA autoantibodies.

Reference: Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, Nishioka M, Penner E. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol.* 2004; 41: 677-83.

169

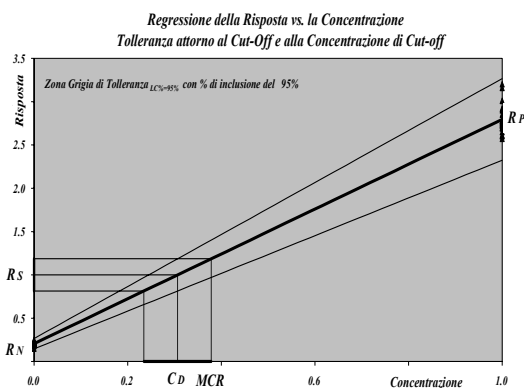
NUOVI PARAMETRI ANALITICI PER I SAGGI IMMUNOMETRICI QUALITATIVI NON COMPETITIVI

Giustini C. *, Chiecchio A. **, Malvano R. °

*UOC Medicina Trasfusionale Ospedale CTO ASL Roma-C. **UOA Fisica Sanitaria Ospedale Mauriziano Torino. °Biomedica srl Milano

I saggi immunometrici qualitativi non competitivi, quali ad esempio quelli impiegati per ricercare HBsAg, anti-HCV e anti-HIV, forniscono una risposta numerica continua che si mantiene lineare per un ampio intervallo di concentrazione. Un approccio statisticamente corretto permette di esplicitare la funzione di regressione lineare che correla la concentrazione (anche nominale) delle specie reagenti con le risposte mediante l'impiego di un controllo negativo e uno positivo opportunamente scelto. Disporremo così di parametri efficaci per il controllo di qualità quali la "concentrazione discriminare" (CD) ovvero la concentrazione corrispondente alla risposta soglia (RS) con cui effettuare il controllo delle sedute analitiche. Calcolando i limiti di tolleranza, ad un livello di probabilità prescelto, della funzione di risposta in base ai replicati di misura, si otterrà una definizione statisticamente rigorosa dell'ampiezza della "zona grigia" attorno alla risposta soglia da cui è possibile stabilire l'estensione della corrispondente "zona grigia" di incertezza attorno alla concentrazione discriminare, i cui limiti saranno quelli impiegati per la carta di controllo e il cui limite superiore definisce correttamente la minima concentrazione rilevabile (MCR), valore che stima in modo statisticamente corretto la sensibilità di misura. Intendiamo riportare i dati ottenuti dall'applicazione dei metodi sopramenzionati nella pratica operativa di routine presso l'UOC di Medicina Trasfusionale dell'Osp. CTO di Roma.

Chiecchio A., Giustini C., Malvano R.: "Definizione dei parametri valutativi e di controllo per i saggi immunometrici nella sierologia trasfusionale". *La Trasf. del Sangue*, 46, n°4, luglio-agosto 2001 (240-247).



170

PRESTAZIONI ANALITICHE DEI REAGENTI PER LA DETERMINAZIONE DI ESTRADIOLO CON IL SISTEMA LIAISON

Fortunato A., Zanuso L., Soffiati G.
Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale "S. Bortolo" – Viale F. Rodolfi, 37 - 36100 Vicenza
e-mail: antonio.fortunato@ulssvicenza.it

Introduzione: Il 17-β Estradiolo (E2) è uno steroide sintetizzato principalmente dalle cellule della teca della granulosa dell'ovaio e dal testicolo ed in minima parte dalla corteccia surrenalica. E' il piu' potente estrogeno naturale, trasportato in circolo legato alla SHBG ed all'albumina ed eliminato con le urine e con le feci. La valutazione dei livelli plasmatici di questo ormone rappresenta un indice di funzionalita' ovarica e dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Bassi livelli possono essere presenti in caso di ermafroditismo, pseudo-ermafroditismo, ipogonadismo ipogonado- tropinico, terapia estroprogestinica, sindrome di Turner. Elevati livelli possono essere dovuti a gravidanza, tumori ovarici estradiolo secernenti, tumori testicolari estrogeno secernenti, tumori testicolari con iperplasia surrenale, insufficienza epatica.

Materiali e metodi: Sono state valutate le prestazioni analitiche dei reagenti immunochemiluminescenti per il sistema completamente automatico LIAISON (DiaSorin, Saluggia VC). La precisione è stata valutata secondo il protocollo NCCLS EP-15: 6 diversi campioni di controllo sono stati analizzati, in 4 replicati, per 5 sedute analitiche. La sensibilità analitica è stata calcolata dalla relazione tra il segnale ottenuto dalla determinazione di due standard: uno a concentrazione zero (20 replicati) ed uno a concentrazione 10 pg/mL (10 replicati). È stata effettuata una prova di diluizione utilizzando un campione con concentrazione di 620 pg/mL ed eseguendo delle diluizioni seriali (fino a 1:16) con siero deprivato di Estradiolo. Sono stati confrontati inoltre i risultati di 100 campioni di pazienti, 50 maschi e 50 femmine con concentrazioni inferiori a 500 pg/mL, ottenuti con il sistema in valutazione con le determinazioni eseguite su due altri sistemi automatizzati: Advia Centaur (Bayer, Tarrytown NY) e Immulite 2000 (DPC, Los Angeles).

Risultati: La precisione tra le serie ha dato CV compresi tra il 5 ed il 12% per concentrazioni tra 64 e 817 pg/mL. La sensibilità analitica è risultata di 12 pg/mL. La retta di regressione tra valori attesi e misurati nella prova di diluizione è risultata $y = 0,95x - 7$

$R^2 = 0,99$. Le rette di regressione secondo Passing e Bablok ottenute per il confronto dei metodi sono le seguenti: verso Advia Centaur $y = 0,70x + 2,5$ $R^2 = 0,85$ (I.C. 0,81-0,88 $p < 0,0001$); verso Immulite 2000 $y = 0,89x - 1,7$ $R^2 = 0,81$ (I.C. 0,76-0,85 $p < 0,0001$). I risultati del confronto dei metodi sono stati analizzati anche con i metodi grafici di Bland & Altman e Mountain plot. **Conclusioni:** le prestazioni analitiche (precisione, sensibilità e linearità) del sistema in esame risultano adeguate alle necessità cliniche e confrontabili con altri sistemi automatizzati.

171

CITOCINE PROINFIAMMATORIE (IL8 E TNFALFA) IN PAZIENTI UREMICI: INFLUENZA SULLA RISPOSTA ALL'EPO.

Fanelli L. Laboratorio di Patologia Clinica; Falvo E. U.O. Nefrologia e Dialisi - ASL n° 6 Lamezia Terme

Lo stato infiammatorio cronico caratterizza l'uremia dei pazienti dializzati. Esso è in relazione a malnutrizione, aterosclerosi, anemia e diminuita sensibilità alla risposta all'EPO. I processi di eritropoiesi sono influenzati dalla via proinfiammatoria mediata dalle citochine. Il TNF-alfa rilasciato negli stati infiammatori cronici negli studi in vitro ha dimostrato un potente effetto soppressivo sull'accrescimento delle cellule eritroidi. **Scopo:** Abbiamo voluto verificare nei nostri pz in trattamento dialitico lo stato infiammatorio misurando le concentrazioni plasmatiche di markers dell'infiammazione quali IL8 e TNFalfa. Abbiamo inoltre voluto verificare se il TNFalfa potesse influenzare il trattamento dell'anemia con EPO. **Metodologia:** Sono stati osservati 36 pz di cui 16 maschi e 22 femmine di età compresa tra 26 e 84 anni.; i dosaggi immunometrici (IL8 e TNFalfa) sono stati eseguiti su prelievi ematici in predialisi con metodo analitico in chemiluminescenza (Immulate-One Medical Sistem). **Risultati:** per la citochina IL8 (v.n. compresi tra 5-15 pg/dl) è stato osservato un valore superiore alla norma nel 55% dei pz; per il TNFalfa (vn < 8,1 pg/dl) i valori erano superiori alla norma nella totalità dei pz. Inoltre, si è valutato il livello di Hb raggiunto (target 11g/dl) e la dose settimanale proKg somministrata. Sono stati distinti i pz in due gruppi: *gruppo A* quelli che superavano il target e *gruppo B* quelli che ne rimanevano sotto. Il 50% dei pz si collocava nel gruppo A, l'altro 50% si collocava nel gruppo B. Alla totalità dei pz veniva somministrata EPO in dosi settimanali proKg compresi tra 40 e 327 UI/Kg/sett. Tra i pz del gruppo A solo il 25% riceveva EPO > 100UI /Kg/sett, tra quelli del gruppo B invece l'83,3%.

Il TNF alfa risultava superiore alla norma in tutti i pz che ricevevano EPO > 100UI/Kg/sett; tra questi il 72% presentava TNFalfa > di 12. Tra i pz del gr A che riceveva EPO > 100UI/Kg/sett solo il 22,2% aveva TNFalfa > 12; tra i pz del Gr B con EPO > 100UI /Kg il 61,1% aveva TNFalfa > 12. **Conclusioni:** in tutti i nostri pz è stato rilevato uno stato infiammatorio cronico attraverso misurazione di IL8, TNFalfa. La presenza di una citochina proinfiammatoria come il TNFalfa influenza la sensibilità alla risposta con Epo. Nei nostri pz il 50% raggiunge livelli di Hb target. Tra i pz i che non lo raggiungono, l'83% riceve una dose di Epo > 100UI/Kg/sett; tra questi il 61,1% presenta TNF alfa > 12. Tutto questo in accordo con quanto riportato in letteratura dove lo stato infiammatorio espresso da alti valori di TNFalfa influenza le variazioni di sensibilità alla risposta con EPO.

The inflammatory response and epoietin sensitivity I. C. Macdougall, A. Cooper – Nephrol Dial Transplant 2002

Clinical Relevance of cytochine production in hemodialysis. G. Pertosa, G. Grandaliano, L. Gesualdo, FP Schena - Kidney Int. 2000

172

COMPARISON OF TWO BNP IMMUNOASSAYS USING THE SAME ANTIBODIES AND STANDARD MATERIALS.

Storti S, Prontera C, Mercuri A, Turchi S, Emdin M, Passino C, Zyw L, Zucchelli GC and Clerico A.
CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

We compared analytical performance and diagnostic accuracy of a fully automated chemiluminescence “sandwich” immunoassay for BNP (ACCESS System, Beckman-Coulter) with those of a POCT method (TRIAGE BNP test Biosite), which use the same antibodies. Within run and total imprecision (CV%) of the ACCESS assay, tested following NCCLS EP5-A protocol, were respectively 3.39%, 4.75%, 1.56% and 8.44%, 10.45%, 5.92% in 3 plasma samples with different BNP concentrations (i.e. 52.6, 96.3 and 1095 ng/L). Analytical sensitivity of ACCESS system, evaluated in 3 different runs, was 0.30 ± 0.08 ng/L. Functional sensitivity, evaluated at 15 % CV, of both methods was similar (about 15 ng/L). The mean BNP concentration, in 91 healthy subjects (51 women and 40 men; age range 16-71 years) was 14.1 ± 12.8 ng/L (median 10.5 ng/L, range 1-53 ng/L, 97.5° percentile 45 ng/L) with ACCESS and 11.6 ± 8.3 ng/L (median 8.9 ng/L, range <5-51.9 ng/L, 97.5° percentile 35 ng/L) with TRIAGE method. In 193 patients with confirmed heart failure (46 women and 147 men, age 63.7 ± 12.8 years), the mean BNP levels were 376 ± 649 ng/L with ACCESS and 329 ± 647 ng/L with TRIAGE. A close linear regression was found between the BNP values of the two methods (ACCESS= $51.3 + 0.961$ TRIAGE; $R=0.922$; $n=305$). The two methods showed similar diagnostic accuracy in separating healthy subjects from patients with mild (NYHA class I-II, AUC=ACCESS 0.860 vs. 0.847 TRIAGE; $n=122$) or severe (NYHA class III-IV, AUC=ACCESS 0.997 vs. 0.998 TRIAGE; $n=71$) heart failure, showing also similar optimal cut-off values in discriminating healthy subjects from patients with mild heart failure (53.0 vs 52.6 ng/L).

173

CLINICAL APPLICATION OF HIGHLY-SENSITIVE THYROGLOBULIN ASSAY IN DIFFERENTIATED THYROID CANCER

Iervasi A. ⁽¹⁾, Iervasi G. ⁽¹⁾, Ferdeghini M. ⁽²⁾, Zucchelli G.C. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ CNR, Institute of Clinical Physiology, Pisa

⁽²⁾ Nuclear Medicine, University Verona

Thyroglobulin (Tg) detection in serum represents a very high specific tumor marker for patients treated for differentiated thyroid cancer (DTC) because of its tissue specificity and limited tissue distribution. Tg measurement represents the most sensitive and specific modality in the follow-up of patients with DTC which should be guided by a protocol with a high negative predictive value to reduce the number of unnecessary investigations and to identify the few individuals with a previously unrecognized risk of recurrence. Its main utility is in identifying tumor well before it is apparent by imaging techniques or physical examination. With the development of highly-sensitive methods of earlier Tg detection like Tg Access Beckman of which we studied carefully the analytical performance (1), another factor must be taken into account: how to deal with patients with low but measurable Tg levels without demonstrated thyroid cancer?

In these perspective, we are evaluating patients in follow-up for DTC and submitted to rh-TSH test. At the moment 74 patients have been included in the study: 92% with baseline Tg < 0.1 ng/mL (group I); 3% with baseline Tg=0.1 ng/mL (group II); 5% with baseline Tg > 0.1 ng/mL (group III). 87% of patients belonging to group I showed Tg after rh-TSH stimulation always <0.1 ng/mL; 3% Tg=0.1 ng/mL and 10% Tg >0.1 but <1 ng/mL, only 1 of these patients had Tg >0.6 ng/mL, which is the cut-off suggested after rh-TSH. 75% of patients belonging to group III had Tg after stimulation <1 ng/mL.

The value of 0.1 ng/mL represents the functional sensitivity of Tg Access Beckman assay that we calculated at 20 CV%. This method showed equally high sensitivity and specificity both during suppressive therapy (baseline Tg under L-T4 treatment) and after TSH stimulation with rh-TSH, being 0.01 ng/mL the detection limit of the assay.

Further studies in large series of DTC treated patients will indicate the “true” usefulness of Tg values measured by the Access Beckman assay in clinical practice. Important area of applications could be: the identification of a “complete” excision after total thyroidectomy and 131-I ablation (i.e. Tg values <0.1 ng/mL); the identification of “low risk” patients at “relatively higher risk” of recurrence, on L-T4 treatment (i.e. Tg values >0.1 ng/mL <1 ng/mL); the identification of patients at “very low-risk” of recurrence on L-T4 treatment (i.e. Tg values <0.1 ng/mL).

This will probably place the need for rh-TSH stimulated Tg testing in a new perspective, in terms of diagnostic validity together with cost-benefit analyses.

1. Iervasi A. et al. 2004. Diagnostic performance of a new highly sensitive thyroglobulin immunoassay. *Journal of Endocrinology* 182: 287-294

174

IMPRECISIONE DELL'ANALISI DEI MARCATORI TUMORALI SU MODULAR SWA

Cecere R., Biella F.M., Bertona M., Mocarelli P.
Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio
Ospedale di Desio, Desio (MI)

Introduzione: La crescente rilevanza clinica dei marcatori tumorali richiede delle specifiche di qualità stringenti che assicurino delle buone performance analitiche, utili a supportare le decisioni sulla diagnosi e sulla terapia. A tal proposito un obiettivo fondamentale è la precisione del metodo, mantenuta giorno dopo giorno.

Materiali e metodi: Sono stati analizzati i valori dei controlli di qualità dei marcatori tumorali (CEA, CA125, CA19-9, CA15-3, PSA, PSA libero) effettuati quotidianamente, nel periodo gennaio 2004-maggio 2005, sull'analizzatore Modular SWA (Roche). Per l'esecuzione di queste analisi sono stati utilizzati i sieri di controllo Lyphochek Tumor Marker (Biorad), livelli 1 e 2. I suddetti controlli venivano gestiti a livello informatico mediante un programma che applica le regole di Westgard per verificare lo stato di calibrazione dello strumento. In totale sono stati considerati 19.248 dati. Per ciascun marcatore tumorale sono stati calcolati: media, deviazione standard (DS) e coefficiente di variazione (CV%). Inoltre è stata eseguita un'analisi delle regole di Westgard violate.

Risultati: Nel periodo indicato, lo studio eseguito ha evidenziato dei CV% ampiamente inferiori ai traguardi analitici per l'imprecisione (CV%<10, secondo le linee guida del NACB). In particolare i risultati migliori si sono evidenziati per i test CA125, con dei CV% di 6,2 e 5,2 (liv.1 e 2) e CEA, con dei CV% di 6,2 e 5,4 (liv.1 e 2). Il valore di imprecisione peggiore è stato riscontrato per il livello 2 del CA 15-3 con un CV% di 9,3.

Una successiva analisi ha rilevato, per la maggior parte degli analiti testati, una frequenza inferiore all'1% di errori di misura che abbiano portato alla violazione delle regole di Westgard, rendendo necessaria una ricalibrazione del canale. In particolare, violazioni delle regole correlate all'errore casuale, indice di imprecisione analitica, sono risultate trascurabili, mentre quelle correlate all'errore sistematico (inaccuratezza) si sono verificate con occorrenza di poco superiore all'1% solo per i test CA19-9, CA 125 e CEA.

Conclusioni: I valori ottenuti per i coefficienti di variazione soddisfano pienamente i traguardi analitici riportati in letteratura, basati sull'esperienza clinica e l'attuale uso della tecnologia immunometrica. Lo studio delle regole di Westgard violate mette in risalto l'ampia stabilità di questi test, che non richiedono frequenti calibrazioni. Queste caratteristiche contribuiscono ad assicurare un controllo rigoroso della qualità delle procedure analitiche per il dosaggio dei marcatori tumorali.

Bibliografia: NACB-Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic (2005) (www.nacb.org).

175

COMPARISON OF THE ANALYTICAL PERFORMANCE AND DIAGNOSTIC ACCURACY OF SOME BNP AND NT-proBNP IMMUNOASSAYS

Prontera C, Storti S, Emdin M, Passino C, Zyw L, Poletti R, Turchi S, Mercuri A, Zucchelli G.C. and Clerico A.
CNR Institute of Clinical Physiology, via Moruzzi,1
Pisa

Several studies have demonstrated that BNP and NT-proBNP levels are useful in the stratification of patients with congestive heart failure for the detection of left ventricular systolic and/or diastolic dysfunction and for the diagnosis of dyspnea.

We evaluated analytical performance and diagnostic accuracy of five immunoassays for BNP (IRMA Shionogi, ADVIA Bayer, MEIA AxSym, TRIAGE Biosite, ACCESS Beckman-Coulter) and one for NT-proBNP (ECLIA, Roche) in the same plasma samples (about 350 from normal and patients with cardiovascular diseases), using identical pre-analytical conditions. Analytical sensitivity was 3.0 ng/L for ADVIA, 2.5 for IRMA, 4.3 for MEIA, 5 for TRIAGE, 1 for Access and 4 for ECLIA, respectively. Functional sensitivity, computed from the imprecision profile at 20 CV%, was 7 ng/L for ADVIA, 9 for IRMA, 7 for Access, 8 for TRIAGE, 20 for MEIA, and 9 for ECLIA, respectively. The BNP value corresponding to the 97th percentile of normal distribution was 40 ng/L for IRMA, 105 for MEIA, 45 for ADVIA, 40 for TRIAGE, 45 for Access, and 155 for ECLIA NT-proBNP, respectively. The BNP assay methods showed similar diagnostic accuracy in separating well-matched healthy subjects (n=91) from patients with mild heart failure (NYHA class I-II, n=166), as assessed by ROC analysis, with AUC ranging from 0.865 for ADVIA to 0.902 for IRMA; while the NT-proBNP ECLIA showed a significantly better diagnostic accuracy (AUC= 0.945, 95% CI 0.915-0.976, p<0.01). On the other hand, excellent performance (AUC values ranging from 0.982 to 0.999) were given by all immunoassay methods in discriminating between healthy subjects and patients with severe heart failure (NYHA class III-IV, n=113).

176

ENEASYSTEM III: AUTOMAZIONE DEI TEST IgG ED IgG4 SPECIFICHE NELLA DIAGNOSI DI REAZIONI AVVERSE AD ALIMENTI

De Fulvio M., Di Zenzo P.

Policlinico Militare di Roma, Dipartimento Diagnostica

Già in passato ma più insistentemente di recente, dati in letteratura riportano l'impiego delle IgG specifiche e della sottoclasse IgG4 verso alimenti quale possibile strumento di approfondimento diagnostico in varie forme di reazioni avverse agli alimenti (meccanismo immunologico non di tipo I, IgE mediato) (1,3). Un coinvolgimento immunologico è oggi ipotizzato in varie patologie gastrointestinali ed in particolare nella sindrome del colon irritabile dove il tests IgG ha riportato risultati incoraggianti (remissione dei sintomi) dopo una mirata dieta di eliminazione(2). L'allergia alimentare IgE mediata ha un'incidenza riportata fra l'1 ed il 3% della popolazione (3) mentre riconosciamo una percentuale maggiore di popolazione che riporta una vasta serie di sintomi (cefalea, stanchezza post prandiale, affaticamento muscolare, colite, gastrite) da intolleranza ad alimenti. Incoraggiati dal fermento che si riscontra su tale argomento e pressati dalla richiesta sempre crescente, dallo scorso anno nel nostro laboratorio vengono effettuati tests di IgG ed IgG4 specifiche per alimenti. La metodologia applicata è ELISA (Bioallergy) a temperatura controllata con curve Master legate al lotto reattivi (Standard interno di IgG e IgG4); l'allergene è adeso non su micropiastra, ma ad una caratteristica fase solida, l'ACE® (BIOALLERGY) cameretta reattiva ad elevata capacità legante modellata ad U. Le risposte sono espresse in U/ml. La metodica è automatizzata sulla strumentazione ENEASYSTEM III già in nostro possesso per la diagnostica allergologia (IgE totali e specifiche). Il sistema è in grado di processare 30 campioni per 450 tests per seduta, in totale automazione dalla preparazione dei campioni da tubo primario (Bar Code e diluizione automatica) alla refertazione. I tempi di lavoro variano da 3h e 30 min. a circa 5 ore per 450 tests ed i parametri IgG ed IgG4 possono essere eseguiti contemporaneamente. Il software gestionale facilita le operazioni di avvio delle sedute e possiede un programma di CQ interno e di Archivio storico dei pazienti. Il test automatizzato mostra buoni valori di C.V. intra-assay (<8%) ed inter-assay (<12%). La lista degli allergeni alimentari disponibili nel catalogo Bioallergy è ampia e comune ai tests IgE specifiche ed IgG ed IgG4 specifiche (magazzino unico). Poiché moderati livelli di IgG ed IgG4 specifiche per alimenti sono da considerarsi fisiologici abbiamo in un primo momento valutato i livelli di cut-off proposti dalla metodica (bassi, medio, alti) con uno studio su una popolazione (n=60, età media=32) per 30 alimenti base.

1. A. Speciani, Biologi Italiani; 2002; 11: 69-71
2. W. Atkinson et al., Gut 2004;53:1459-1464
3. E. Errigo, S. Torre, Allergie e intolleranze alimentari - Lombardo Editore, 2002

177

ENEASYSTEM III: VALUTAZIONE DELLA NUOVA LINEA PER IL TORCH.

Plutino V., Rosa A.M., Antonetti R.

Azienda OORR – Università di Foggia, Lab.Analisi 2

Il sistema Eneas, già presente nel nostro Laboratorio per l'automazione delle linee allergologia, celiachia e autoimmunità, è stato impiegato, per la routine del TORCH, in parallelo al sistema in uso, Liaison (DiaSorin) con metodologia CLIA. La Bioallergy propone infatti una nuova linea completa di prodotti per ToRCH (Toxo, Rubella, Cytomegalovirus sia IgG che IgM ed Herpes 1 IgG, Herpes 2 IgG ed Herpes 2 IgM) con metodologia ELISA. Scopo del lavoro è stato verificare l'impatto di tale sistema nell'organizzazione del settore oltre che verificarne la concordanza analitica con il metodo in uso. Il sistema è in grado di processare 29 campioni per 150 tests per seduta, in totale automazione dalla preparazione dei campioni da tubo primario (Bar Code e diluizione automatica) alla refertazione. L'esecuzione dei parametri è in simultanea. I tempi di lavoro variano da 90 a 105 minuti e la preparazione della seduta richiede tempi massimi di 15 minuti. I ridotti tempi di esecuzione dei tests consentono, laddove necessario, l'avvio di una seconda seduta nella stessa mattinata, per la stessa linea ToRch o AI (compreso Morbo Celiaco) la cui seduta multiparametrica presenta anch'essa tempi di esecuzione assai brevi (90-105 min). Per routine medio-piccole il sistema risponde ottimamente al concetto di accorpare più linee. Il software gestionale facilita le operazioni di avvio delle sedute e il collegamento ad Host consente una rapida programmazione del lavoro. La metodologia applicata è ELISA a temperatura controllata con curve Master (legate al lotto reattive e fornite dalla Ditta) con ricalibrazione a 2 punti ogni 15 gg. Gli antigeni sono adesi alla caratteristica fase solida del sistema (ACE, camerette reattive ad elevata capacità legante). Nel dosaggio IgM, al pari del sistema Diasorin è prevista l'aggiunta di un reagente (IgG di capra anti-IgG umane) per eliminare ogni interferenza. Sono stati testati 53 pazienti per un totale di 447 tests (247 IgG e 200 IgM) per l'intero pannello di antigeni. Applicando i Cut-off suggeriti dalle Aziende abbiamo rilevato un'ottima concordanza globale (94%). In particolare per Toxoplasma e Rubella IgG entrambe le Ditte impiegano Standard Int. (UI/ml) con dati sovrapponibili.

	TOXO		RUBELLA		CYTOMEG	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
	94.3%	94.4%	100%	91.8%	98%	94.1%
HERPES (1+2)						
	IgG	IgM				
	91.0%	87%				

I Tests IgM (Standardizzazioni interne) mostrano globalmente una correlazione < al 94% dovuta alle discordanze rilevate sull'Herpes; i due sistemi hanno infatti specificità diverse, Diasorin Herpes 1+2, Bioallergy solo Herpes2. Alcune positività Diasorin non sono state infatti riscontrate con il test Eneas.

178**COLESTEROLO TOTALE: CORREZIONE DELLA INACCURATEZZA ANALITICA E I SUOI EFFETTI SULLA CLASSIFICAZIONE DEI PAZIENTI (2)**

Carobene A.¹, Ceriotti F.¹, Ferrero C.A.¹, Guerra E.¹, Roncoroni G.², Bossi G.², Suigo E.³, Rosso R.³, Manzato F.⁴, Chiozzi M.⁴, Bonvicini P.⁵, Venturini R.⁵, Plebani M.⁵

1 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano

2 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese

3 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano"

– stabilimento di Magenta

4 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Mantova

5 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Scopo del lavoro è quello di studiare la distribuzione dei valori del colesterolo delle popolazioni di individui "sani", cercando di ridurre l'errore di accuratezza dei laboratori partecipanti. Sono paragonate le percentuali dei pazienti con livelli di colesterolo al di sotto dei valori soglia di 200 e 240 mg/dL.

Materiali e metodi. Vedi anche Abstract "Verifica della commutabilità dei sieri NIST per Colesterolo, Acido Urico, Sodio e Potassio". Ogni giorno, per un massimo di 25 giorni lavorativi, sono stati raccolti campioni di circa 20 individui "sani" ed analizzati in singolo insieme ai 2 sieri NIST e a un pool congelato preparato da ciascun centro utilizzato come CQI. In base ai risultati ottenuti durante la prova di commutabilità è stato possibile ricalcolare i dati dei pazienti dei vari centri, secondo i seguenti approcci:

- attraverso i parametri della retta di regressione lineare ottenuta, per ogni laboratorio, sui 10 pool (10 p);
- attraverso la normalizzazione dei risultati ottenuti da ciascun laboratorio sui sieri IRA e IRB;
- attraverso la normalizzazione dei risultati ottenuti da ciascun laboratorio sui due sieri NIST;
- attraverso la normalizzazione dei risultati ottenuti da ciascun laboratorio sui due NIST il cui valore target è stato corretto per l'errore matrice ($NIST_C$).

Risultati. In tabella le caratteristiche della popolazione complessiva, sia con i dati grezzi non corretti, sia dopo correzione secondo i diversi approcci.

n° =	Grezzi	Dopo correzione			
		10 p	IR	NIS T	NIS T _C
Media mg/dL	192,9	185,1	184,7	198,0	184,1
media a	191,0	183,6	183,0	196,1	182,6
Rango 200 %	60,3 %	68,3 %	69,9 %	54,3 %	68,8 %
Rango 240 %	90,2 %	93,6 %	93,7 %	86,0 %	93,5 %

Conclusioni. Paragonando le % dei pazienti entro i valori soglia, possiamo concludere che la correzione dell'inaccuratezza dei laboratori, utilizzando i parametri delle rette di regressione ottenute sui 10 pool, può essere effettuata anche attraverso la normalizzazione sui due sieri IR commutabili. Al

contrario la correzione sui due materiali NIST non commutabili, rispetto alla popolazione non corretta, peggiora ulteriormente la misclassificazione dei pazienti. La possibilità di eliminare l'errore di accuratezza, con la conseguente corretta classificazione dei pazienti, è invece possibile anche attraverso l'utilizzo dei NIST, ma solo dopo la correzione del loro effetto matrice con il calcolo del fattore correttivo risultato dalla prova di commutabilità.

179

POLIMORFISMO DELLA PARAOXONASI (PON1-192) IN PAZIENTI CON BASSI ED ELEVATI LIVELLI DI COLESTEROLO HDL

Rolla R, Suno A, Bardone B, Cerutti C, Scarano D, Sulas MG, Zumaglini P, Pergolini P e Bellomo G
Laboratorio RR CC, Ospedale Maggiore della Carità, Novara

Background: La paraoxonasi (PON) è un enzima ancillare delle lipoproteine ad alta densità (HDL) che verosimilmente svolge un ruolo nella patogenesi della malattia aterosclerotica e che potrebbe contribuire all'effetto antiaterogeno delle HDL. Il meccanismo molecolare è ampiamente sconosciuto.

Scopo della ricerca: Valutazione di un polimorfismo genico della PON (PON1-192) e del fenotipo associato in pazienti con bassi (IHDL) ed elevati livelli (hHDL) di colesterolo HDL

Metodologia: Sono stati selezionati due gruppi di pazienti comparabili per sesso ed età con bassi (n=73, HDL=15.5±3.8 mg/dL, ApoAI=34.7±3.9 mg/dL) ed elevati (n=85, HDL= 87.6±6.4 mg/dL, ApoAI=168±13.3 mg/dL) livelli di colesterolo HDL. Il polimorfismo PON1-192 è stato valutato mediante real-time PCR. L'attività enzimatica è stata misurata utilizzando come substrati sia paraoxon (paraoxonasi) a 492 nm che fenilacetato (arilesterasi) a 270 nm.

Risultati: La prevalenza dello stato wild type è stata di 47.9 % in IHDL e di 43.9 % in hHDL. La prevalenza dello stato eterozigote è stata di 46.6 % in IHDL e di 44.7 % in hHDL. La prevalenza dello stato omozigote mutato è stata di 5.5 % in IHDL e di 11.4 % in hHDL. Le attività paraoxonasi ed arilesterasi sono risultate più basse in IHDL (0.0219±0.0098 e 0.207±0.0569 abs/min rispettivamente) rispetto a hHDL (0.0480±0.0213 e 0.0735±0.0353 abs/min rispettivamente). A fronte di una differenza di circa 5 volte nei livelli di colesterolo HDL e di ApoAI, le differenze di attività paraoxonasi ed arilesterasi, normalizzate per ApoAI, sono risultate essere di circa 3 volte. Il polimorfismo genico PON1-192 è risultato essere associato con variazioni significative della attività paraoxonasi ma non arilesterasi senza differenziazione fra i due gruppi di pazienti.

Conclusioni: La presenza di livelli molto bassi o elevati di colesterolo HDL e di ApoAI non appare essere associato con uno specifico polimorfismo genico di PON1-192. Nella ipocolesterolemia HDL sono presenti bassi livelli di attività paraoxonasi ed arilesterasi indipendentemente del polimorfismo genico PON1-192. E' verosimile ipotizzare che i fattori responsabili della ipocolesterolemia HDL possano condizionare una ipoespressione di paraoxonasi, anche se la semplice riduzione del vettore plasmatico dell'enzima quale causa della riduzione dell'attività paraoxonasi non può essere esclusa con certezza

Riferimento: Li H, Liu DP, Liang C: Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. J.Mol. Med. 81, 766-779, 2003

180

VALUTAZIONE DI PARAMETRI DI OSSIDAZIONE IN PLACCHE ATEROSCLEROTICHE E PLASMA DI PAZIENTI ENDOARTERIECTOMIZZATI

Fortunato G.*, Di Taranto M.D.*, D'Armiento F.P.§, Mazzaccara C.*, Morgante A.*, Sacchetti L.*, Porcellini M.#, Bracale U.M.#, Del Guercio L.#, Salvatore F.*.

* Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche e CEINGE Biotecnologie Avanzate, § Dip. di Scienze Biomorfologiche e funzionali, # Dip. Assistenziale di Chirurgia Generale, Toracica e Vascolare, Università "Federico II", via S. Pansini 5, 80131 Napoli, Italia.

Introduzione I fenomeni ossidativi sono alla base dei processi che portano allo sviluppo ed alla progressione della placca aterosclerotica. L'obiettivo di questo lavoro è dosare i prodotti della perossidazione lipidica, come la malonildialdeide (MDA), nella lesione e nell'intima prossimale non ateromatosa, di correlare tali distribuzioni con i livelli plasmatici e inoltre di confrontare i livelli plasmatici di LDL ossidate (oxLDL) e di anticorpi diretti contro le oxLDL (Ab anti-oxLDL) con lo stadio della placca aterosclerotica.

Metodi A 44 pazienti sottoposti ad endoarteriectomia carotidea è stata prelevata la placca, una porzione di intima prossimale, ed è stato effettuato un prelievo di sangue. Il dosaggio della MDA è stato effettuato con un saggio colorimetrico. I livelli di oxLDL e di Ab anti-oxLDL sono stati valutati tramite saggi ELISA. Le medie sono state confrontate con il test di T o con l'ANOVA. Le correlazioni delle distribuzioni sono state analizzate con la correlazione Rho di Spearman.

Risultati I livelli di MDA in pmoli/mg proteine sono risultati molto più alti (p<0,015) nella placca (mediana=2,77; 25°percentile = 1,48; 75° percentile= 9,24) rispetto all'intima non ateromatosa (mediana= 1,64; 25°percentile=0,33; 75°percentile=3,00). I livelli di MDA nella placca sono correlati con quelli dell'intima con un coefficiente di -0,368 (p<0,014) ma non correlano con quelli nel plasma. I livelli di oxLDL normalizzati per i livelli di LDL sono risultati significativamente diversi nei vari stadi della lesione aterosclerotica (p<0,005), in particolare tra la lesione calcifica, stadio 7 e la lesione fibrosa, stadio 8 (p<0,009). Gli Ab anti-oxLDL non risultano associati con lo stadio della lesione.

Conclusioni La MDA è molto più abbondante nella placca che nel tessuto normale con distribuzione inversamente correlata. Livelli più alti di oxLDL sono associati allo stadio 8, placca fibrosa, in cui si è verificata la regressione del core lipidico avvalorando l'ipotesi che l'ossidazione si verifichi nella placca e i prodotti vengono poi rilasciati in circolo.

Bibliografia 1- Holvoet P., et al. Arterioscler. Thromb Vasc Biol. 2001; 21:844-848.

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 21/01/05.

181**SITOSTEROLEMIA AS A RISK FACTOR FOR ATHEROSCLEROSIS: A FAMILY STUDY.**

^aMannucci L.; ^aCortese C.; ^aBertucci P.; ^aIndigeno P.; ^aLiberatoscioli L.; ^bBertolini S.; ^{a,c}Federici G.

^aDepartment of Laboratory Medicine, "Tor Vergata" University Hospital, Viale Oxford 81, 00133 Rome, Italy

^bDepartment of Internal Medicine, University of Genoa, Viale Benedetto XV 6, 16132 Genoa, Italy

^cLaboratory of Biochemistry, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital, Piazza S. Onofrio 4, 00165 Rome, Italy

Sitosterolemia (MIM #210250) is an autosomal recessive disorder characterised by elevated plasma levels of plant sterols and cholesterol due to increased intestinal sterol absorption and reduced biliary excretion. Sitosterolemic patients are frequently hypercholesterolemic and can develop tendon xanthomas, atherosclerosis and premature coronary heart disease (CHD). Sitosterolemia is caused by gene mutations in either of two ATP-binding cassette (ABC) half transporters, ABCG5 and ABCG8 (Heimerl *et al.*, Human Mutation, Mutation in Brief #518, 2002 Online). Aim of our project was to identify gene mutations in ABCG5 or ABCG8 in patients diagnosed of sitosterolemia on the basis of their clinical symptoms and biochemical features, and to identify any relationship between genotype/phenotype and the occurrence of atherosclerotic events. We describe a novel nonsense mutation which was found in exon 10 of ABCG5 by genomic DNA sequencing on blood samples from a 5-year-old girl from Iran showing clinical and biochemical features of sitosterolemia. The mutation results in a premature termination of ABCG5 protein. Biochemical markers of cholesterol synthesis (cholestanol, desmosterol, lathosterol) and absorption (campesterol, sitosterol) were also measured in the proband's nuclear family by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GCMS). Genetic analysis revealed that also her mother and brother are homozygous for the same mutation while the father is a heterozygous, which is consistent with their clinical and biochemical features. This family study broadens the spectrum of the ABCG5/ABCG8 mutations causing sitosterolemia and helps highlight the correlations between such gene mutations, biochemical phenotype and the development of cardiovascular disease.

182**IS THE CSF 24S-HYDROXYCHOLESTEROL A SUITABLE BIOMARKER FOR MILD COGNITIVE IMPAIRMENT?**

Leoni V.(a,c), Shaafit M.(a), Salomon A (b).

a) Division Of Clinical Chemistry, and b) Section Of Geriatric Medicine, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden; c) Division Of Biochemistry And Genetics, National Neurological Institute "C.Besta", Via Celoria 12, Milano (MI), Italy

There is a need of effective biomarkers showing whether or not a patient with mild cognitive impairment (MCI) will progress to Alzheimer's disease (AD) with dementia. At the present three cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers are in general use: total tau, phospho-tau and β -Amyloid ($A\beta_{42}$) (assayed by ELISA). These markers are regarded to have high capacity to differentiate early AD from normal ageing. We have analysed by isotope dilution-mass spectrometry the CSF levels of a new marker for neuronal degeneration, the 24S-hydroxycholesterol (24OHC, a neuronal specific product of cholesterol metabolism by neurons) in patients with MCI. For reasons of comparison, we also analysed these levels in patients with AD and Controls. There was a significant correlation between CSF levels of 24OHC with tau and phospho-tau ($r = 0.55$, $P < 0.001$ and $r = 0.56$, $P < 0.001$, respectively) in both groups of patients. The levels of 24OHC were found to be significantly higher in both MCI and AD patients compared with Controls ($P < 0.001$). 50% of the patients contemplated for MCI were found to have elevated levels of 24OHC (using a 95th upper percentile set cut-off) whereas the levels of the other markers were found to be pathologically altered in less than 20% of the patients. All the MCI patients with normal levels of 24OHC had normal levels of the other markers. In patients with AD the percentage of patients with altered levels of 24OHC, tau, phospho-tau and $A\beta_{42}$ was similar (ranging from 55 to 67%). The 24OHC determination in CSF is likely to be a more sensitive test for MCI than the other biomarkers and that a normal level of 24OHC in CSF may have a high predictive value in this group of patients.

Leoni V, Masterman T, Mousavi FS, Wretling B, Whalund LO, Diczfalusy U, Hillert J, Bjorkem I. Diagnostic use of Cerebral and Extracerebral Oxysterols. Clin Chem Lab Med 2004;42:186-191

183**LIVELLI SIERICI DI HDL COLESTEROLO E HIV**

Pucillo L.P.¹, Valente E.¹, Di Stasio E.², Bonfigli S.³, Antinori A.³

¹I Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche e ³III Divisione - via Portuense 292 - 00149 - Roma.N.M.I. "L.Spallanzani" IRCCS

²Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica - U.C.S.C. - Largo F. Vito 1, 00168 - Roma

La terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) in pazienti HIV, ha rallentato il decadimento funzionale del sistema immunitario e prolungato in modo significativo l'aspettativa di vita. Purtroppo, ha introdotto problematiche relative alla cronicizzazione e agli effetti collaterali, quali insorgenza di diabete di II tipo e sindrome lipodistrofica, associate all'aumento delle complicazioni cardiovascolari legate ad alterazioni dei livelli plasmatici di trigliceridi e colesterolo. Concomitanti fenomeni infiammatori, inoltre, potrebbero essere causa di modificazioni molecolari delle LDL che innescano il processo aterogenico. La relazione tra livelli di colesterolo e stato immunitario sono state analizzate tramite uno studio retrospettivo dei dati registrati nell'archivio informatico del Laboratorio di Patologia Clinica, ottenuti su 505 pazienti HIV, di cui 358 in terapia, in osservazione presso il Day Hospital della III Divisione dell'INMI "L. Spallanzani" IRCCS. I dati analitici sono stati ottenuti, su strumentazioni automatiche di routine (Modular PP Roche, Ca-1500 Dasit, Epics Coulter) e secondo metodiche prescritte dalle ditte produttrici. I dati estratti dal sistema informativo riguardavano parametri metabolici (glicemia, colesterolo, trigliceridi, HDL), indici infiammatori (proteina C reattiva e fibrinogeno) ed immunologici (CD4), nonché lo stato HIV e la terapia antiretrovirale. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il t-test, test non parametrici e regressioni lineari. CD4, colesterolo totale ed HDL, risultano più alti nel gruppo di pazienti in terapia mentre non c'è differenza significativa per le altre variabili. Esiste, inoltre, una correlazione diretta tra livelli di colesterolo totale ed HDL con i CD4 ($p < 0.01$) per tutti i pazienti. Inoltre, nei pazienti non in terapia, si evidenzia una correlazione inversa ($p = 0.03$) del rapporto colesterolo totale/HDL, e una tendenza ($p = 0.07$) di HDL con la proteina C reattiva. I risultati indicano la stretta correlazione esistente tra sistema immunitario e colesterolo totale ed HDL sottolineando, inoltre, l'effetto ipercolesterolemizzante della terapia antiretrovirale. Eventi infiammatori intercorrenti nei pazienti non in terapia determinano una diminuzione del colesterolo totale e HDL con un maggiore impatto su HDL. Questo dato, in particolare, può essere importante per ulteriori studi riguardanti modificazioni molecolari del colesterolo nella progressione dell'aterosclerosi.

The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group
N Engl J Med. 2003 Nov 20;349(21):1993-2003.

184**INCREASED LEVELS OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE IN PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY**

Del Ry S.; Maltinti M.; Prontera C.; Iervasi A.; Emdin M.; Giannessi D.; Neglia D.

CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy.

C-type natriuretic peptide (CNP) is widely expressed throughout the vasculature and is found in particularly high concentrations in the endothelium. Recent studies have demonstrated that CNP is a novel endothelium-based vasodilator peptide able to complement the actions of nitric oxide and prostacyclin. Elevated CNP levels in heart failure (HF), similarly to other natriuretic peptides (NP), are interpreted as part of a compensatory vasodilating response counteracting depressed endothelial NO-dependent function. So far, no data are available on plasma levels of this peptide in patients with Dilated Cardiomyopathy (DCM). The aim of the study was to evaluate CNP peripheral levels and the relationship with other neurohormones, coronary microvascular and left ventricular (LV) function in patients with DCM. We studied 47 DCM patients (17 women and 30 men, 5 in NYHA I, 27 in NYHA II, 15 in NYHA III LVEF% 37.3 ± 1.4 , age 61.3 ± 1.9 years, mean \pm sem) and 21 healthy controls. Plasma CNP levels were determined by a radioimmunoassay after a preliminary solid-phase extraction on Sep-Pak C18. Plasma ANP, BNP, PRA and aldosterone were measured by specific immunometric assays while noradrenaline and adrenaline by HPLC procedure. The plasma levels of CNP in healthy subjects were 2.7 ± 0.22 pg/ml, mean \pm sem, and resulted significantly increased in patients with DCM: 6.3 ± 0.49 pg/ml, with (NYHA III) or without (NYHA I-II) overt HF, $p < 0.0001$. In DCM patients a significant correlation was observed between CNP and LVEF ($r = 0.46$, $p = 0.0013$). A significant positive correlation was also observed with ANP ($r = 0.63$, $p < 0.0001$, mean values 77.6 ± 11.8 pg/ml), BNP ($r = 0.70$, $p < 0.0001$, 151.1 ± 27.4 pg/ml) and with noradrenaline ($r = 0.38$, $p = 0.007$, 534 ± 50 pg/ml) while no correlation was found with PRA (3.2 ± 0.6 ng/ml/h), aldosterone (192.1 ± 18.8 pg/ml), and adrenaline (40.4 ± 6.3 pg/ml). A significant correlation ($r = 0.45$, $p = 0.04$) was observed between CNP and myocardial blood flow (MBF) at rest evaluated by positron emission tomography study. Our results demonstrated a significant increase of plasma CNP levels in DCM patients with or without HF. CNP elevation was associated with the increase of ANP, BNP and noradrenaline plasma levels while was independent of other hormone activation. These observations, together with the inverse relation with LVEF and MBF, suggested that NP could be early activated in tune with ventricular and microvascular dysfunction in this disease.

Ref.: Scotland RS, Ahluwalia A, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. Pharmacol Ther 2005; 105(2):85-93.

185**CORRELAZIONE TRA CONCENTRAZIONE SIERICA DI cTnI E DI NT-proBNP IN PAZIENTI CON AMILOIDOSI AL.**

¹Russo P., ¹Palladini G., ¹Lavatelli F., ²Albertini R., ²Vadacca G., ³Melzi D'Eril G.V., ²Moratti R., ¹Merlini G.

¹Centro per lo Studio delle Amiloidosi – Lab. di Biotecnologie e ²Lab. di Chimica Clinica, IRCCS S. Matteo e Università di Pavia; ³Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università di Milano.

Nell'amiloidosi AL la prognosi è determinata in larga misura dalla presenza e dall'entità del coinvolgimento del cuore. Il frammento N-terminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP, marcatore di funzione ventricolare) e le troponine (marcatori di danno strutturale) sono importanti indici prognostici.^{1,2} Lo studio della correlazione tra questi marcatori, oltre a meglio definirne il valore prognostico, può chiarire la patogenesi del danno cardiaco.

Materiali e metodi. Il NT-proBNP e la troponina I (cTnI) sono stati quantificati nel siero di 173 pazienti con amiloidosi AL (età mediana 62 anni, *range* 28-91, 91 maschi). La concentrazione di NT-proBNP è stata determinata in elettrochemiluminescenza (ECLIA, Roche) su Elecsys System 2010. I limiti superiori dell'intervallo di riferimento in uomini e donne sono, rispettivamente, 227 e 334 pg/mL (età ≥ 50 anni) e 88 e 153 pg/mL (età < 50 anni). La concentrazione di cTnI è stata determinata in chemiluminescenza (Beckman Access). Il limite superiore dei valori di riferimento è 0.06 ng/mL, uguale a quello utilizzato dal gruppo della Mayo Clinic, che ha individuato a 0.1 ng/mL per la cTnI e a 332 pg/mL per il NT-proBNP il *cutoff* con la massima rilevanza prognostica nell'amiloidosi AL.²

Risultati. La concentrazione mediana di NT-proBNP era 1206 pg/mL (*range*: 16-187200 pg/mL), quella di cTnI 0.03 ng/mL (*range*: 0-0.92 ng/mL). Il NT-proBNP era > 332 pg/mL in 126 pazienti (73%), la cTnI era > 0.1 ng/mL in 36 (21%). La correlazione tra concentrazione di NT-proBNP e di cTnI era significativa ($p=8 \times 10^{-7}$; *test* di Spearman). La concentrazione di NT-proBNP era significativamente più alta ($p=1.3 \times 10^{-8}$; Mann-Whitney *U test*) nei pazienti con cTnI superiore al *cutoff* (mediana 12234 pg/mL, *range*: 969-187200 pg/mL) rispetto ai pazienti con cTnI inferiore al *cutoff* (mediana 836 pg/mL, *range*: 16-33927 pg/mL). Nessuno dei pazienti con cTnI > 0.1 ng/mL aveva NT-proBNP entro il limite di riferimento. Il NT-proBNP appare più sensibile nell'individuare il danno cardiaco da amiloidosi AL e ha un *range* dinamico superiore alla cTnI. Questi risultati hanno rilevanza fisiopatologica: nelle fasi iniziali della cardiomiopatia amiloidotica prevale il danno funzionale (NT-proBNP) mediato dagli aggregati di catene leggere, il danno strutturale (cTnI) è tardivo e probabilmente secondario ai depositi fibrillari.

1. Palladini G, et al. *Circulation* 2003; 107:2440-5.
2. Dispenzieri A, et al. *J Clin Oncol* 2004; 18: 3751-7.

186**NT-PROBNP AFTER CARIOVERSION IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION AND MAINTENANCE OF SINUS RHYTHM**

¹Melzi d'Eril G.V., ²Porreca W., ²Biondi M.L., ¹Belletti S., ¹Tundo F., ¹Lombardi F., ¹Barassi A., ³Merlini G.

¹Dip di Med. Chir. e Odont., Univ di Milano; ²Lab di Anal Ospedale San Paolo, Milano; ³Lab di Biotecn., IRCCS S. Matteo, Dip di Bioch., Univ di Pavia.

The 108-amino acid prohormone of the natriuretic peptide type B, synthesized primarily by the left ventricle of the heart, is cleaved during secretion into a N-terminal fragment, NT-proBNP (1-76) and physiologically active BNP (77-108). NT-proBNP has proven more amenable to clinical measurement in specimens due to its substantially longer *in vivo* half-life and *in vitro* stability compared to BNP. Stretch of atrial myocytes and altered ventricular filling pattern associated with atrial fibrillation (AF) may represent an adequate stimulus for BNP secretion. We therefore evaluated whether recovery of sinus rhythm and normalization of atrial function could affect BNP values. We measured with an electrochemiluminescent assay (Elecsys, proBNP, Roche Diagnostics) serum NT-proBNP in 30 patients (21 men, mean age 66 ± 7.3) with preserved left ventricular ejection fraction (LVEF, $61 \pm 6\%$) before and after three weeks of electrical cardioversion (ECV) for persistent AF. Intra-assay (inter-assay) precision for NT-proBNP assay was 3.5% (4.1%) and 2.9% (3.7%) at concentrations of 251 and 805 pg/mL, respectively. ECV was successful in all the subjects. In spite of normal LVEF, NT-proBNP values before ECV were above the reference values (< 280 pg/mL) in all but one patients. The mean NT-proBNP level was significantly higher before than 3 weeks after ECV [633 (150-1715) pg/mL versus 432 (42-1357) pg/mL, $P=0.001$]. These data indicate that persistent AF and abnormal atrial dynamics are strongly associated with increased concentrations of NT-proBNP. Recovery of sinus rhythm is accompanied by rapid reduction of NT-proBNP concentrations likely to be due to the restoration of a more physiological hemodynamic function in the atria.

Reference: Nattel S. *Nature* 2002; 415: 219-26

187**PLASMA ADRENOMEDULLIN, BNP, NT-PROBNP AND dP/dt max IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE.**

Morales M.A.; Del Ry S.; Prontera C.; Maltinti M.; Startari U.; Emdin M.; Giannessi D.
CNR, Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy.

Background: Neuro-hormonal activation plays a major role in the pathophysiology of chronic heart failure (CHF). Between the different neuro-hormones, B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP (NT-proBNP) are widely used in clinical practice as indices of left ventricular dysfunction and prognosis. Another peptide, adrenomedullin (AM), with endogenous natriuretic and vasodilator activities has been hypothesized as a marker of cardiac dysfunction. The most widely used index of left ventricular (LV) function is LV ejection fraction (EF); however, it is highly load-dependent; the isovolumic phase indices of LV function as dP/dt max are less load-dependent and should theoretically better reflect LV function.

Aim: To assess in patients with different degrees of LV dysfunction, the possible relationship between circulating AM, BNP and NT-proBNP plasma concentrations and dP/dt max.

Method: In 51 CHF patients (NYHA class I: 6, II: 22, III: 19 and IV: 4) and 20 age-matched healthy subjects, AM, BNP and NT-proBNP were assessed within the same day of an echo-Doppler exam. dP/dt was calculated from the Doppler tracing of the mitral regurgitation jet on 5 consecutive beats.

Results: In CHF patients all peptides were higher than in controls and higher in NYHA III-IV than in NYHA I-II class ($p < 0.001$). AM plasma levels were 20.0 ± 1.5 vs. 13.3 ± 0.7 pmol/l, mean \pm SEM, $p = 0.015$, BNP 381 ± 77 vs. 12 ± 2 pg/ml, ($p < 0.0001$), NT-proBNP 2149 ± 570 vs. 52 ± 4 pg/ml, ($p < 0.0001$). A significant correlation was found between dP/dt max and all the peptides ($r = 0.582$ for AM, $p < 0.001$, $r = 0.46$ for BNP, $p < 0.005$, and $r = 0.46$ for NT-proBNP, $p = 0.006$). When dP/dt max and natriuretic peptides were analyzed by means of the multivariate regression analysis AM showed the best relation with dP/dt ($p < 0.001$) while no correlation was found between AM and LVEF.

Conclusion: The association between AM and this functional index may provide a better characterization of CHF patients in different functional class.

Ref: Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM. Adrenomedullin and heart failure. *Regulatory Peptides* 2003; 112:51-60.

188**DETERMINAZIONE DEI BASSI LIVELLI DI TROPONINA I IN PAZIENTI CON SOSPETTO DI MALATTIA ISCHEMICA CORONARICA**

Brunati P., Colzani C., Galli C.*, Terramocci R.
Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Valduce, Como
*Abbott Divisione Diagnostici, Roma

Introduzione e scopo. La troponina cardiaca I, a causa della

sua grande cardiospecificità, ha un valore diagnostico elevato per malattia ischemica coronarica. Recentemente è stato proposto a livello nazionale ed internazionale di adottare un valore soglia che corrisponda alla concentrazione più bassa per la quale il dosaggio impiegato abbia una variabilità massima (CV) del 10%. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'impatto della determinazione di troponina cardiaca I e T nella nostra realtà operativa anche in base ai valori soglia adottati.

Materiali e metodi: Sono stati valutati pazienti consecutivi ricoverati in urgenza con sospetto di malattia ischemica coronarica. Il primo campione di siero ottenuto al ricovero è stato analizzato per troponina I (TnI) con un metodo automatizzato in chemiluminescenza (Abbott Architect), considerando sia la soglia per infarto acuto (IMA) stabilita mediante curve ROC ($0,3$ ng/mL- TnIA) che quella basata sul CV del 10% ($0,032$ ng/mL-TnIB). I risultati per TnI sono stati confrontati con quelli per TnT ottenuti con il test Roche Elecsys (soglia: $0,03$ ng/mL), e quelli di entrambi i metodi sono stati messi in relazione con la diagnosi finale, formulata in base a criteri elettrocardiografici e clinici.

Risultati. Abbiamo incluso nello studio 108 pazienti (57 maschi, 51 femmine, età media 73 anni), 15 dei quali (14%) con diagnosi finale di IMA. La sensibilità sul primo campione di siero era 53,3% per TnT, 40% per TnIA e 86,7% per TnIB. Per contro, i valori relativi di specificità erano rispettivamente 91,4%, 96,8% e 75%. L'accuratezza complessiva dei test di routine (Mioglobina, CK-MB, TnT e TnIA) era rispettivamente 78,7%, 85,2%, 86,1% e 88,9%. Per 8 pazienti era stato possibile ottenere una diagnosi iniziale di IMA utilizzando la soglia alternativa per TnI. Questi pazienti presentavano valori di TnI $>0,032$ ng/mL ma $<0,3$ ng/mL e 5 di essi erano negativi anche per TnT.

Conclusioni: L'adozione di un test sensibile per troponina I e dei nuovi criteri di positività consente di incrementare la sensibilità per IMA nelle prime fasi del ricovero. E' opportuno stabilire dei protocolli d'intesa con i reparti per sfruttare al meglio questa possibilità diagnostica.

189**COMPARISON OF THE ANALYTICAL PERFORMANCE OF SOME FULLY AUTOMATED SYSTEMS FOR PLASMA TROPONIN-I MEASUREMENT**

Parri M.S., Storti S., Prontera C, Iervasi A., Di Cecco P., Giannelli I., Fontani G., Zucchelli G.C., Clerico A. Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Dipartimento di Medicina Molecolare e di Laboratorio, sezioni di Pisa e Massa.

Objective Cardiac Troponin I (cTnI) represents the reference method for assessment of the myocardial damage. cTnI assay is routinely used for rule in/out, risk stratification, and follow-up of patients with acute coronary artery syndrome. We evaluated the analytical and clinical performance of the advanced immunoassay for cTnI carried-out on AxSYM (Abbott Diagnostic Division) and then we compared these characteristics to those of the previous version of this assay and also to cTnI on ACCESS 2 Immunoassay System (Beckman Coulter, Inc.).

Methods We assayed plasma samples of healthy subjects (66) and cardiac patients (131) with AxSYM Plus system called old and advanced TnI (Adv TnI) and with ACCESS system.

Results An improvement of more than 10 fold in analytical and functional sensitivity (10%CV) was observed for the advanced cTnI AxSYM compared to the previous method. The kinetics of cTnI release was similar, as evaluated in 20 patients with typical AMI. A close linear relationship was found between the two methods on AxSYM system (old cTnI= 7.436 + 6.858 Adv cTnI; R=0.968, n=214) and the ACCESS (old cTnI=7.154 + 7.9 ACCESS TnI, R=0.876, n=158, Adv cTnI=0.23 + 1.209 ACCESS TnI, R=0.927, n=160). However, a wide bias was found between the old and the new AxSYM method (mean difference=117.61, p<0.0001) as well as between advanced AxSYM and ACCESS method (mean difference=2.604, p<0.0001).

Conclusion The advanced method carried out on AxSYM system shows a significantly improved analytical performance compared to the previous one. However, a significant bias always exists between advanced AxSYM and ACCESS method.

Reference Oltrona L, Ottani F, Galvani M; Italian Working Group on Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology and the Associazione Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri (ANMCO). Am Heart J. 2004 Sep;148(3):405-15.

190**LA TROPONINA I : ESISTE DIFFERENZA FRA I SESSI E NELLE FASCE DI ETA' ALL'ACCESSO DEL PRONTO SOCCORSO? ANALISI DI 3486 DATI . STUDIO PRELIMINARE.**

Romano C.¹, Zuccaro M.¹, D'Amario C.², Angelini G.², Massimini F.¹, Di Cosmo C.¹, Fazio M.³, Toniato E.³, Cipollone F.³, Mezzetti A.³ and Martinotti S.^{1,3}

¹Unit of Clinical Pathology, SS Annunziata University Hospital, University of Chieti, Chieti, Italy

²Unit of Clinical Pathology, Atri Regional Hospital, Atri, Teramo, Italy

³Clinical Research Center, Center of Excellence on Aging, University Foundation, Chieti, Italy

Nell'ambito di uno studio retrospettivo, dopo l'estrapolazione di 24.790 dati di troponina I (CTNI) dal LIS degli anni 2003-2004 e la successiva analisi statistica descrittiva ed inferenziale, abbiamo voluto analizzare un sottogruppo campionario specifico ed in particolare il gruppo di campioni all'accesso del pronto soccorso del P.O. SS Annunziata di Chieti.

Il nostro scopo era verificare se:

- 1) esistesse differenza significativa fra maschi e femmine nel numero di dosaggi richiesti e nelle concentrazioni trovate.
- 2) esistesse differenza fra i sessi nelle varie fasce di età.

in quanto avevamo riscontrato delle differenze significative nel gruppo campione di 24.790 casi precedentemente studiati

La tabella 1 riepiloga i dati e mostra che l'82.2% dei dosaggi sono stati minori o uguali a 0.1 ng/mL valore di cut-off adottato nel nostro laboratorio e che i M sono in maggioranza in tutte le classi.

Tabella 1. Numrosità campionario in classi di CTNI

Classi CTNI (ng/mL)	%	n. di determinazioni	F	M
< 0.1	46.9	1631	654	977
= 0.1	35.3	1232	497	735
> 0.1	17.8	623	238	385
totale	100	3486	1389	2097

Interessanti osservazioni possono essere fatte dall'analisi del grafico di distribuzione delle medie e dei rispettivi CI in relazione alle fasce di età (fig.1):

A) la differenza fra sessi non è significativa e le medie aumentano con l'aumentare dell'età in entrambi i sessi anche se statisticamente non in modo significativo

B) la media più alta e il maggiore CI sono presenti nelle fasce 21-40 anni ed è chiara la differenza di distribuzione fra M e F

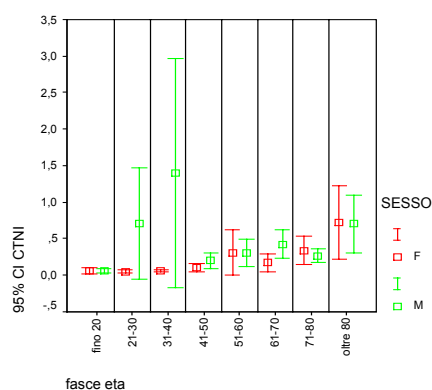
la prima osservazione conferma la non differenza fra i sessi in questo gruppo campione, come ci aspettavamo, al contrario di quello che avevamo riscontrato nel gruppo campione di 24.790 casi dove esisteva una differenza fra M e F in tutte le fasce di età.

190

La seconda osservazione ci conferma lo stesso fenomeno che avevamo rilevato nello studio del gruppo campione di 24.790 dati ossia che la media più alta ed il maggiore CI erano presenti nei M e nella fascia di 31-40 anni.

Avremmo potuto definire “fenomeno statistico” questa coincidenza di distribuzione nei due gruppi campione, ma è nelle nostre prospettive di lavoro continuare la valutazione dei dati nei prossimi anni in modo da ampliare la casistica e approfondire lo studio con ulteriori indagini diagnostiche, cliniche e biomolecolari.

Figura 1: Error Bar della CTNI rispetto alle classi “fasce di età” e sesso



191

VALUTAZIONI ANALITICHE DI MARCATORI DI DANNO MIOCARDICO SU ARCHITECT CI8200

*Poggesi M., §Galli C., §Scarà M.T., *Rapi S., *Brogioni M.

*Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Laboratorio Generale, AOU-Careggi, Viale Morgagni 85, 50134 (Firenze)

§Abbott Diagnostici, Via Mar della Cina 262, 00144 (Roma)

INTRODUZIONE Le troponine cardiache risultano i marcatori biochimici di riferimento nella diagnosi di IMA e per la loro determinazione sono disponibili metodiche che per sensibilità e specificità ci consentono di valutare aree di danno miocardico fino ad oggi non evidenziabili. Tuttavia per molti di questi metodi, l'imprecisione analitica ai livelli decisionali risulta troppo elevata rispetto a quella suggerita dal documento congiunto ESC/AAC¹.

SCOPO DELLO STUDIO Valutazione dei reagenti Abbott per Troponina I, Mioglobina e CK-MB su Architect ci8200 secondo protocolli NCCLS: studio della sensibilità analitica, sensibilità funzionale, precisione, intervallo di riferimento e comparazione con metodo in uso (Boheringer Dimension RxL).

MATERIALI E METODI La sensibilità analitica è stata testata mediante la misura di due calibratori a bassa concentrazione (4 sedute in 4 giorni diversi: 10 repliche del calibratore A e 4 del B per ciascun analita): rispettivamente 0 e 3,8 ng/mL per CK-MB, 0 e 30 ng/ml per Mioglobina, 0 e 0,25 ng/mL per Troponina I. La sensibilità funzionale per CK-MB e Troponina I è stata misurata in 10 giorni diversi (2 repliche di 10 diluizioni scalari di un campione positivo). Tre sieri di controllo a diverso livello di concentrazione per i tre analiti sono stati impiegati per l'esecuzione del test di precisione (NCCLS EP5-A protocollo in 5 giorni). La prova di comparazione è stata condotta analizzando campioni di siero umano (N>100) in parallelo su Architect ci8200 e strumentazione in uso secondo protocollo NCCLS EP9-A2.

RISULTATI E CONCLUSIONI I dati più interessanti risultano quelli relativi alla misura della Troponina I: la sensibilità analitica del metodo è risultata 0,003 ng/mL e la sensibilità funzionale (CV=10%) pari a 0,034 ng/mL. L'imprecisione analitica misurata (CV%) è stata di 8,3 ad una concentrazione di 0,11 ng/mL, 4,9 a 0,47 ng/mL e 5,0 a 12,53 ng/mL. Buone sono inoltre risultate anche la concordanza totale positivi/negativi (97,5%) e la correlazione (retta di regressione lineare: n=154; y=0,7636x+0,005; r=0,96) con sistema Dimension RxL. Nel nostro studio il valore di Architect TN I al 99° percentile è risultato inferiore alla sensibilità analitica del metodo: il risultato, di particolare interesse, è comunque da confermare su una casistica più ampia.

¹Alpert JS, Thygesen K, et al. J Am Coll Cardiol. 2000;36(3):959-969.

192**ALBUMINA MODIFICATA IN CORSO DI ISCHEMIA IN PAZIENTI CON DOLORE TORACICO IN PRONTO SOCCORSO**

Mion M., Zaninotto M., Trombin A., Altinier S., Rocco S.*, Tosato F.*, Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, *Dipartimento di Emergenza, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova

Scopo dello studio: valutare l'utilità della determinazione dell'albumina modificata in corso di ischemia (Ischemia Modified Albumin, IMA; ACB® Test, Ischemia Technologies) nel riconoscimento dell'ischemia cardiaca in pazienti con dolore toracico in Pronto Soccorso (PS). Dove non diversamente specificato, le determinazioni sono state condotte su siero (KU/L). **Imprecisione** (n=10) (controlli=C1, C2, C3; pool=P1, P2) (media, CV%): nella serie=C1 (37, 5.4), C2 (56, 1.8), C3 (89, 1.1), P1 (87, 1.1), P2 (122, 1.6); tra serie=C1 (47, 6.4), C2 (62, 6.5), C3 (93, 3.2), P1 (81, 4.9), P2 (121, 4.9). **Confronto siero-plasma** (litio-eparina) (n=23): bias, CI (95%)=-2.56, -6.11/+0.98. **Stabilità dell'analita:** a 2, 4, 6, 24 ore dal prelievo, l'IMA è stata determinata in campioni di siero conservati a 2-8 °C (A), 25 °C (B) o dopo conservazione del sangue a 2-8°C e centrifugazione immediatamente prima dell'analisi (C). Recupero (range %): (A)=87.50-104.00, (B)=87.50-108.00, (C)=80.00-101.33. **Intervallo di riferimento** (n=133, 58 maschi+75 femmine; 19-76 anni): (95° percentile, range=95, 64-118). **Studio clinico:** 31 dei 65 pazienti (33 maschi+32 femmine; 26-90 anni) che si sono presentati con dolore toracico sono stati dimessi direttamente dal PS mentre 34 sono stati ricoverati. Per questi ultimi la diagnosi di dimissione è stata: infarto miocardico acuto (n=8), sindrome coronarica acuta (n=4), altra diagnosi (n=22). Livelli decisionali dei marcatori cardiaci determinati sui campioni dei pazienti raccolti in PS: mioglobina (Myo=70 µg/L), troponina I (cTnI=0.15 µg/L), IMA (95). 1 dei 3 pazienti con infarto miocardico acuto e valori di Myo e cTnI in PS inferiori al livello decisionale, presentava un valore di IMA elevato (103). 2 dei 31 pazienti dimessi (Myo, cTnI, IMA: 38, 0.00, 107 e 24, 0.03, 103 rispettivamente) si sono ripresentati in PS per un nuovo episodio di dolore toracico e sono stati successivamente dimessi con diagnosi di infarto miocardico acuto. **Conclusioni:** lo studio dell'imprecisione così come il confronto siero-plasma e lo studio di stabilità dell'analita confermano le indicazioni del produttore: i coefficienti di variazione risultano contenuti; il siero costituisce l'unica matrice da utilizzare; la stabilità dell'analita rimane un aspetto critico da non sottovalutare. Il limite superiore dell'intervallo di riferimento (95) è risultato invece leggermente superiore a quello dichiarato (85). Anche se l'incidenza di valori "falsamente" elevati del marcatore risulta non trascurabile, le prestazioni osservate depongono a favore di una potenziale utilità del test nella valutazione in urgenza del paziente con sospetto di ischemia cardiaca.

193**HIGH LEVELS OF HOMOCYSTEINE ARE ASSOCIATED WITH SMALL NUMBER OF CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN PATIENTS WITH A SIMILAR DEGREE OF CAD**

Faccini G., Pizzolo F.*, Girelli D.*, Friso S.*, Olivieri O.*, Martinelli N.*, Bertozzo L., Gerani C., Bonetto M.G., Villa G.*, Bozzini C.*, Guarini P.*, Trabetti E.*, Corrocher R.*, G.C. Guidi.

Dipartimento Scienze Morfologico Biomediche - Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche-

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Università di Verona

Background. Since 1969, with McKully's studies, the association between very high levels of homocysteine (>100 micromol/L) and an elevated risk of premature cardiovascular disease is well established. Whether the much more frequent finding of moderate-intermediate increase in plasma total homocysteine (tHcy) causes cardiovascular disease has been subject of debate.

Aim. Within groups with different levels of tHcy but the same degree of coronary atherosclerosis disease (CAD), we evaluated the number of coexisting major traditional risk factors.

Methods. We studied 180 patients with angiographically documented coronary artery disease, divided in three groups according to tHcy levels: 60 patients with normal tHcy (<15 µmol/L), 60 patients with moderate and 60 patients with intermediate hyper-homocysteinemia (between 15 and 30 and between 30 and 100 micromol/L respectively). Within the Verona Heart Project, the three groups of patients were sorted in order to be exactly matched for gender, age, degree of coronary artery disease (P> 0.95). In all patients we considered the presence of traditional risk factors for CAD (i.e. hypertension, diabetes, hyperlipidemia, smoking habit, familial history of ischaemic heart disease) and evaluated the determinants of tHcy levels.

Results. The population as a whole was subdivided for having a great or small number of traditional risk factors (i.e. ≤3 and >3, respectively). The group with >3 risk factors was significantly less represented among patients with high tHcy levels (36.2%, 21.7%, 15.1 %, in patients with normal, moderate, intermediate tHcy respectively, P =0.029). Folate and vitamin B12 concentrations, creatinine, MTHFR 677C>T polymorphism were the major determinants of tHcy in our population. Of note, creatininemia gradually increased with increasing tHcy levels (90.99, 101.59, 109.87 micromol/L in patients with normal, moderate, intermediate tHcy respectively, P =0.001).

Conclusions. Among patients with the same degree of coronary artery disease, those with high tHcy concentrations show a lower number of traditional risk factors.

194

BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE IN OPEN HEART SURGERY

[#]Carlucci F., [§]Salvi M., [§]Petralia S., [§]Iazzolino P., [§]Vallesi G., [@]Biagioli B., [@]Marchetti L., [@]Carlucci G., [@]Paglia T., [#]Tabucchi A.

[#]Dipartimento di Medicina Interna Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Università di Siena. [@]Dipartimento di Chirurgia e Bioingegneria, Università di Siena. [§]Dipartimento di Medicina di Laboratorio, UO Laboratorio di Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese V.le Bracci 53100 Siena

Background: Brain natriuretic peptide (BNP) is a cardiac peptide whose functions are the regulation of sodium and water homeostasis and the control of intravascular volume and blood pressure. ProBNP is the peptide from which BNP and NT-proBNP originate. NT-proBNP can be found in higher concentration in plasma and is more stable; therefore some Authors suggest that it could be a better biomarker for prognosis with respect to BNP. Elevated BNP concentration in peripheral blood reflects impaired cardiac ventricular function. In some cases, a relationship has been proved between BNP levels and the appearance of complications after surgery (1). However only a few studies have been reported using NT-proBNP as a tool in cardiac surgery. Our aim was to determine NT-proBNP levels in patients undergoing cardiac surgery in combination with markers of myocardial necrosis, Troponin T (TroT) and Myoglobin (Myo) and of oxidative stress, nitrates/nitrites (NOx). In particular, we seek to evaluate whether an hypertrophic heart is more sensible to the ischemia/reperfusion injury following surgical intervention and extracorporeal circulation. **Methods:** A total of 9 patients, scheduled for aortic valve substitution, were recruited. Blood specimens were taken at four time points from the coronary sinus catheter, the first before surgery (t0), before aortic cross clamping (t1), before clamp removal (t2), at 15' from organ reperfusion (t3) and the last 24 h after surgery (t4). Myocardial marker were evaluated by specific Roche Elecsys[®] tests, NOx were evaluated by capillary electrophoresis according to Davies (1999). **Results:** BNP was high in eight of the nine patients before surgery and was found to increase markedly at 24h ($p < 0.001$); starting from normal value, Myo and TroT showed a constant significant increase during surgery up to 24h from intervention ($p < 0.005$). NOx showed a significant increase after reperfusion (t3) with a tendency to normalize after 24h (t4). **Conclusion:** These preliminary data indicate that BNP not only reflect the entity of heart failure but, even if it represents a late index, the entity of BNP response to ischemia/reperfusion positively correlates to the preoperative parameters. The correlation of post-operative cardiac events with pre- and post- surgical NT-pro BNP levels is under investigation.

1- Copa GR et al. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery (2005)

195

SUSTAINED EFFECTS OF EXERCISE TRAINING ON PLASMA NT-PROBNP LEVELS IN PATIENTS WITH STABLE HEART FAILURE.

¹Melzi d'Eril G.V., ²Porreca W., ²Biondi ML., ¹Tumminello G., ¹Lenati L., ¹Guazzi M., ¹Barassi A., ³Merlini G.

¹Dip di Med. Chir. e Odont., Univ di Milano; ²Lab di Anal, Ospedale San Paolo, Milano; ³Lab di Biotecn, IRCCS S. Matteo, Dip di Bioch., Univ di Pavia.

Quantitative measurement of NT-proBNP has been recognized as an excellent tool in diagnosis and management of heart failure (HF). Monitoring its changes over time is now proposed as a guide for the assessment of therapeutic effectiveness in the follow-up of these patients. We investigated whether: a) exercise training (ET) is effective in reducing NT-proBNP levels; b) this effect is sustained; c) changes in NT-proBNP are related with an improved exercise ventilatory efficiency. In the present investigation pre-ET and post-ET (after 3 and 6 months of a standard low-intensity ET program) levels of NT-proBNP (Elecsys, proBNP, Roche Diagnostics) were measured in serum of 15 stable HF patients (NYHA class II to III). Each patient performed a supervised, standard, progressively increasing (personalized ramp protocol) work rate (WR) to maximum tolerance on a cycle ergometer. Intra-assay (inter-assay) precision for NT-proBNP assay was 3.5% (4.1%) and 2.9% (3.7%) at concentrations of 251 and 805 pg/mL, respectively. Ventilatory efficiency, a powerful prognostic indicator of HF severity, was assessed by calculating the slope of the ratio of ventilation (V_E) with respect to CO_2 output (V_{CO_2}). V_E , V_{CO_2} and O_2 uptake (V_{O_2}) were computer calculated breath-by-breath, interpolated second-by-second, and averaged in 10-sec intervals. Peak V_{O_2} was determined by the highest VO_2 achieved during exercise. Results:

	Baseline	3 months	6 months
NT-proBNP (pg/mL)	791±300	389±260 *	212±83 [^] §
Peak V_{O_2} (mL/min/kg)	14.5±2.0	16.4±2.0 *	17.2±4.0* [^]
V_E/V_{CO_2} slope	32±3	29±4 *	27±3 * [^]

*: $p < 0.05$ vs baseline; [^]: $p < 0.01$ vs baseline;

§: $p < 0.05$ vs 3 months

Changes in NT-proBNP at 6 months strongly correlated with those in V_E/V_{CO_2} slope ($r=0.90$; $p < 0.01$).

In conclusion, evidence is provided that NT-proBNP is an additional target of benefits related to ET programs. The lowering effect of ET on NT-proBNP, in stable optimally treated HF patients, is sustained over time and strongly correlates with improvement in ventilatory efficiency. This is the first demonstration that NT-proBNP is strongly correlated with exercise ventilation. Reference: Guazzi M, Reina G, Tumminello G, Guazzi M. J Appl Physiol 2004;97:1866-73

196

CORONARY MICROVESSEL DYSFUNCTION AND OSTEOPONTIN PLASMA LEVELS IN PATIENTS WITH DILATATIVE CARDIOMYOPATHY

Del Ry S.; Maltinti M.; Mazzone A.M.; Sampietro T.; Emdin M.; Giannessi D.; Neglia D.
CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy.

Dilated Cardiomyopathy (DCM) is defined as a non ischemic heart disease characterized by left ventricular (LV) myocardial and coronary microvascular dysfunction. However, genetic, metabolic and inflammatory factors, usually associated with coronary artery disease (CAD), may be also associated with DCM. Osteopontin (OPN) is an extracellular matrix protein, with cytokine functions, involved in acute and chronic responses to tissue injury characterized by inflammation and/or fibrosis. Recently, elevated OPN plasma levels were found associated with the severity and progression of coronary atherosclerosis in CAD and extent of systolic dysfunction in heart failure. No data are available on plasma levels of OPN in patients with DCM and potential relationship with LV and microvascular dysfunction in these patients.

Aim of this study was to measure the OPN plasma levels in DCM patients and to evaluate the possible relationship with myocardial and coronary microvascular function as assessed by 2D-Echo and myocardial blood flow (MBF) at rest and during stress. We studied 48 DCM subjects (9 in NYHA I, 29 in NYHA II, 10 in NYHA III, LVEF% 34.6±1.0, age 59.3±1.4 years, mean±sem) and 56 healthy controls by specific enzyme immunometric assay.

OPN significantly increased in DCM patients with respect to healthy controls (483.2±24.4 vs. 348.3±20.8 ng/ml, p<0.0001).

A significant negative correlation was found between OPN and myocardial blood flow at rest (r=0.52, p=0.011) and during dipyridamole stress (r=0.74, p<0.001). OPN plasma levels significantly correlated with ICAM (r=0.40, p=0.028) in DCM patients.

No correlation was found with C-reactive protein, IL-6 and LV function.

The significant correlation between OPN plasma levels and MBF in DCM suggests a relevant role of this protein in modifying coronary microvascular properties. The relation between OPN and ICAM in DCM may be expression of a local inflammatory process involved in the pathogenesis of coronary microvascular dysfunction.

Ref.: Gravallesse EM. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. J Clin Invest 2003; 112:147-49.

197

VALUTAZIONE DEL BNP IN PAZIENTI CARDIO-OPERATI

Ristori E.*, Gasparri R.*, Poznanski M.*, Cerquetani E. #, Sallustri A.#, Naim M.D.*
P.O.I.Portuense,ASLRMD, *U.O.Lab. #U.O. Card.

Scopo. Il peptide natriuretico di tipo B (BNP) è un ormone cardiaco con proprietà diuretiche, natriuretiche e vasodilatatrici in grado di descrivere lo stato clinico dei pazienti con scompenso cardiaco¹. Questo studio ha lo scopo di verificare l'utilità del dosaggio del BNP nell'ambito della valutazione di una eventuale insufficienza cardiaca in pazienti sottoposti di recente ad interventi cardiocirurgici e ricoverati in terapia riabilitativa. La funzionalità cardiaca è stata valutata attraverso la stima della frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FEVS).

Metodo. Abbiamo valutato la concentrazione del BNP all'ingresso in 133 pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca (bypass = 53%, sostituzione valvolare e valvuloplastica = 31%, protesi vascolare = 8%, interventi combinati = 8%) a distanza di 14±4 giorni dall'intervento. Il BNP plasmatico è stato dosato con il sistema MEIA Abbot AxSYM®.

I valori di BNP sono stati correlati con la FEVS calcolata all'ecocardiogramma 2-D con metodo di Simpson biplano, eseguito entro 24 ore dal prelievo per dosaggio BNP. **Risultati:**

Pazienti, n	133
Età', anni (media ± DS)	67 ± 10
M/F, n	90/43
FEVS ≤45%, n (%)	11 (8%)
BNP <100 pg/mL, n (%)	17 (13%)
BNP >500 pg/mL, n (%)	18 (13,5%)
BNP = 100-500 pg/mL, n (%)	98 (73,5%)

All'analisi univariata, non si è osservata correlazione tra BNP e FEVS, sia nel gruppo totale (r = -0.111, p = 0.201) che nel sottogruppo dei pazienti con FEVS ≤45% (r = -0.49, p = 0.662).

Conclusioni. I nostri dati sembrano indicare che non esista una correlazione tra i valori di BNP ottenuti in pazienti recentemente sottoposti ad interventi cardiocirurgici e la presenza di un eventuale stato di scompenso cardiaco postoperatorio dovuto ad una ridotta funzione ventricolare sinistra. Si può ipotizzare che, in questa particolare categoria di individui, il dosaggio del BNP non rivesta un ruolo determinante nella valutazione dello stato funzionale del muscolo cardiaco. Tuttavia, non è da escludere che il controllo dell'andamento dei valori del BNP, valutato anche a maggiore distanza dall'intervento cardiocirurgico, possa essere di un qualche ausilio nella valutazione prognostica dei pazienti stessi. I dosaggi di BNP estremamente variabili ottenuti nel nostro gruppo di pazienti confermano la complessità della regolazione di questo ormone nonché la difficoltà (e forse l'inappropriatezza) di definirne dei valori soglia. Riteniamo, pertanto, che l'inserimento del dosaggio del BNP nell'ambito degli esami di routine di almeno un sottogruppo di pazienti cardiopatici richieda ancora una attenta valutazione.

(1) Clerico A. et al. Clin Chem 2004; 50:33-50.

198**NT-proBNP ED EMERGENZA CLINICA:
DIAGNOSI DIFFERENZIALE DI DISPNEA.**

Baldini G. *, Cerritelli S. **, Corini G. *, Rossi C. *
* Laboratorio Analisi, P.O. Giulianova Via A.Gramsci, 64021 Giulianova (TE).
** Pronto soccorso P.O. Giulianova, Via A.Gramsci, 64021 Giulianova (TE).

Scopo: Valutare l'efficienza diagnostica del NT-proBNP (frammento amino terminale del pro-ormone del peptide natriuretico BNP) nel differenziare la dispnea d'origine cardiaca da quella di natura polmonare. In questo modo si vuole dimostrare l'utilità di tale marcatore biochimico in una situazione d'emergenza-urgenza come quella del Pronto Soccorso, in quanto permette al medico ospedaliero una rapida diagnosi.

Materiali e metodi: Sono stati studiati 33 pazienti che si sono presentati al P.S. per dispnea: 19 maschi d'età compresa tra i 57 e gli 84 anni e 14 femmine tra i 75 e gli 88 anni; 20 pazienti sono risultati affetti da SC e 13 da BPCO. Il sangue prelevato ai pazienti è stato immediatamente trasferito in provette di polipropilene, queste sono state subito centrifugate e il plasma è stato congelato e conservato a -20°C fino al momento del dosaggio. Il peptide NT-proBNP è stato misurato sui campioni con un sistema completamente automatizzato, con rivelazione in elettrochemiluminescenza (ECLIA), utilizzando l'analizzatore Elecsys 2010 (Roche Diagnostics Germania). Il test ha una durata di 18 minuti. Il metodo presenta un ampio intervallo di misura (5-35000 pg/mL) e una sensibilità funzionale di 5 pg/mL.

Risultati: Una differenza statisticamente significativa è stata osservata confrontando le concentrazioni di NT-proBNP misurate nei pazienti con SC e con BPCO (test di Wilcoxon, $p=0,00001$). Utilizzando il test di Wilcoxon è stata calcolata la mediana delle concentrazioni osservate nel primo gruppo all'ammissione in PS (NT-pro BNP mediana 4054,5 pg/mL; 1-3° percentile 1125-7606 $p<0,01$), risulta significativamente più elevata di quella dei pazienti la cui diagnosi di dimissione identifica in una patologia polmonare la causa principale di dispnea (mediana 187,5 pg/mL, 1-3° percentile 86,33-370). Nel presente lavoro è stato ottenuto un valore di cut-off corrispondente a 250 pg/mL a cui corrisponde un valore di SE pari 0,85 e un valore di SP pari a 0,94. Dal confronto della diagnosi effettuata in PS rispetto a quella di dimissione, emerge che 5 pazienti non correttamente classificati in PS sono stati giustamente inquadrati dal test utilizzando il valore di 250 pg/mL come cut-off.

Conclusioni: la determinazione del NT-proBNP è un test semplice ed accurato che può essere utilizzato per l'inquadramento clinico del paziente che si presenta in PS con un generico sintomo di dispnea. Inoltre un cut-off di 250 pg/mL può essere utilizzato per escludere la presenza di scompenso cardiaco.

199**TAURINA E CARDIOPATIA ISCHEMICA: QUALE
CORRELAZIONE?**

Bianchi L.¹, Venturi C.¹, Colivicchi M.A.², Ballini C.², Selvatici R.³, Della Corte L.², Vergoni W.¹.
¹Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, 51017 Pescia (PT); ²Dipartimento di Farmacologia PreClinica e Clinica, 50139 Firenze; ³Dipartimento di Genetica Medica, 44100 Ferrara.

La taurina (TAU), uno degli aminoacidi più abbondanti nei tessuti umani, è coinvolta in molte funzioni fisiologiche fra cui quella cardioprotettiva. La morte cellulare di aree più o meno estese causate dall'ischemia miocardica in parte può essere attribuita all'apoptosi, processo in cui la taurina sembra essere coinvolta (1).

Obiettivi. Scopo di questo studio è valutare: 1) se i livelli di TAU plasmatici differiscono fra soggetti SANI e soggetti affetti da malattia coronaria acuta (CAD); 2) se tali livelli correlano con la gravità della CAD.

Metodi. In una popolazione di 105 pazienti con CAD e una di 90 pazienti di controllo sani, 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), i livelli di acido folico (AF) e vitamina B₆ e B₁₂ con metodica radioimmunologica (RIA). La gravità della malattia coronaria è stata definita utilizzando il Gensini Cardio Score (GCS)

Risultati. 1) I pazienti con CAD presentano livelli significativamente inferiori di TAU plasmatica rispetto ai SANI ($p<0,05$, Anova-Bonferroni); 2) valori di GCS elevati correlano in maniera significativa con livelli plasmatici di HCY superiori a 15 µM/l, AF inferiori a 4,85 ng/ml e TAU inferiori a 24 µM/l ($p<0,01$, Anova-Bonferroni).

Conclusioni. I dati riportati indicano che: 1) in fase acuta di CAD i livelli di taurina nel plasma sono inferiori a quelli dei soggetti SANI forse per un meccanismo da consumo; 2) esiste una correlazione tra livelli plasmatici ridotti di taurina e gravità di CAD; 3) l'omocisteina e la taurina, metaboliti della metionina, possono svolgere una funzione opposta nella patologia cardiovascolare in accordo con i dati riportati dalla letteratura internazionale. Comunque ulteriori studi sono necessari per definire il ruolo della TAU come fattore protettivo nella CAD.

Bibliografia. Takahashi K., Ohayabu Y., Solodushko V., Takatani T., Itoh T., Schaffer S.W., Azuma J.J. Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41:726-733.

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

Venturi C¹., Colivicchi M.A²., Fattori M²., Della Corte L²., Vergoni W¹., Bianchi L¹.

¹Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Via C. Battisti 2, 51017 Pescia (PT); ²Dipartimento 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 reduttasi (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.

201**CONFRONTO DEL DOSAGGIO DEL BNP CON DUE DIVERSI METODI ANALITICI: TEST CLASSICO BIOSITE TRIAGE BNP SISTEMA POINT OF CARE E TEST BIOSITE TRIAGE BNP AUTOMATIZZATO SU ANALIZZATORE BECKMAN COULTER**

Milli M. **, Petrucci F. *, Veneziani F. *, Spadolini M.P. *, Goedecke** L., S. Cerisano** S, Buzzigoli A. *, Fratoni L. **, Biliotti* G.

*U.O. Laboratorio Analisi Ospedale S. Maria Nuova – Firenze

** U.O. Cardiologia Ospedale S. Maria Nuova – Firenze

Dal 2001 si è instaurata una collaborazione tra l'Unità di Cura dello Scompenso Cardiaco (UCS) ed il Laboratorio Analisi per il dosaggio del BNP in pazienti provenienti dall'UCS e dall'ambulatorio dello scompenso cardiaco.*

E' stato utilizzato a questo scopo il metodo classico della BIOSITE TRIAGE BNP Point of Care gestito dal laboratorio analisi. Questo sistema ha da un lato garantito l'affidabilità della gestione dell'apparecchio e del risultato analitico e dall'altro permetteva di avere il dosaggio del BNP in regime di urgenza nelle 24 ore. Per tale motivo, visto anche il notevole aumento del numero dei pazienti seguiti in follow-up ed il conseguente aumento del numero dei dosaggi del BNP, abbiamo deciso di spostare il dosaggio del BNP su un analizzatore automatico Access Beckman Coulter che è lo strumento utilizzato per il dosaggio della Troponina nel nostro Ospedale. Tale scelta comporterebbe anche una riduzione dei costi.

Ci siamo però posti il problema, passando ad una nuova modalità di dosaggio dello stesso parametro, di valutare la precisione del dosaggio del BNP dei 2 metodi e di calcolare il coefficiente di correlazione tra i dosaggi ottenuti con le diverse apparecchiature.

Materiali e metodi : L'imprecisione totale dei due metodi è stata valutata usando per il BNP TRIAGE classico 2 plasmi di controllo e per Access 3 plasmi di controllo (entrambi forniti dalla ditta Biosite) e 2 pool di plasmi EDTA di pazienti afferenti all'Ambulatorio dello Scompenso. Per l'analisi della correlazione sono stati usati plasmi in EDTA di 50 pazienti dosati con entrambi i metodi (range 18-3790). Tali pazienti sono stati selezionati in base al valore del BNP in 4 gruppi (Gr. A – (18 pz) BNP <100pg/ml – Gr. B (17 pz) BNP 100-300 pg/ml – Gr. C (12 pz.) BNP 300-1000 pg/ml – Gr. D (7 pz.) BNP >1000 pg/ml.).

Risultati: il calcolo dell'imprecisione totale del sistema classico TRIAGE ha dato i seguenti risultati: CV% 5.4 (valore medio 81 pg/ml) e CV% 13 (valore medio 589 pg/ml. Per il metodo Access 2 (CV % testato in riferimento ai criteri indicati nella Linea Guida EP5-A NCCLS): pool 1 = 3.3 % (valore medio 154 pg/ml); pool 2 = 3.2% (valore medio 1134 pg/ml) e sui tre livelli di controlli: 2% (valore medio 84pg/ml), 3% (valore medio 418 pg/ml), 3% (valore medio 2169 pg/ml). Abbiamo verificato una stretta regressione lineare tra i 2 metodi (coefficiente r di correlazione di 0.988. – Intercetta 42.1 – Pendenza 0.95). Le due metodiche hanno dimostrato la stessa capacità di separare i pazienti appartenenti ai 4 gruppi individuati.

201

Conclusioni: Il metodo Access é risultato molto preciso e l'analisi della regressione lineare mostra un'ottima correlazione tra le metodiche. Questo ci permette di affermare che il passaggio tra i due sistemi di dosaggi garantisce il mantenimento di una buona continuit  delle informazioni riguardo all'andamento del BNP nel tempo dello stesso paziente e ci consente l' utilizzo del test in urgenza nelle 24 ore con una riduzione dei costi dell'esame stesso.

Bibliografia: C.Prontera e Coll. – Prestazioni analitiche e cliniche dei metodi immunometrici per la determinazione del BNP e NYT- pro BNP. - Ligand Assay, 9 (2) 2004

Ligand Assay, 9 (2) 2004.

202

VARIAZIONI DEL SISTEMA PAPP-A/IGF-I IN PAZIENTI CON SINDROME CORONARICA.

Carrozza C., *Marchese N, °Conti E, Capoluongo E., Di Stasio E., Palumbo S., *Andreotti F., Zuppi C.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, *Dipartimento di Malattie Cardiovascolari – Universit  Cattolica del Sacro Cuore – Largo F. Vito 1, 00168-Roma

°Istituto di Cardiologia, II Universit  “La Sapienza” Roma

Introduzione: La Pregnancy-associated Plasma Protein A (PAPP-A)   una metalloproteinasi prodotta ad alte concentrazioni dal trofoblasto ma dosabile anche nei maschi e nelle donne non gravide con livelli sierici 100 volte pi  bassi di quelli misurabili in gravidanza.

La PAPP-A agendo sulle binding protein 4 e 5 rende biodisponibile l'IGF-I che   "libero" di legarsi ai suoi recettori. L'IGF-I ha effetti insulinosensibilizzanti, antiapoptotici e cardioprotettivi. In letteratura sono presenti lavori discordanti sulle variazioni di PAPP-A e IGF-I in pazienti con sindrome coronarica acuta. In un precedente studio abbiamo automatizzato un metodo manuale ELISA per la determinazione di PAPP-A ultrasensibile al fine di una eventuale introduzione nella pratica routinaria anche in pazienti con sindrome coronarica.

Scopo del lavoro: Per meglio interpretare le variazioni della PAPP-A nella malattia coronarica abbiamo valutato il rapporto tra questa metalloproteinasi e il free- IGF-I in una popolazione di pazienti affetti da sindrome coronarica e sottoposti a sfida ipossica per by-pass aorto-coronario.

Metodi: Sono state determinate le concentrazioni plasmatiche di PAPP-A e free-IGF-I su 100 pazienti affetti da sindrome coronarica, prima, a 24 e 48 ore dall'intervento di by-pass aorto-coronario.

Le determinazioni di PAPP-A ultrasensibile ($\mu\text{UI/mL}$) sono state effettuate su TRITURUS GRIFOLS con metodo ELISA: Ultrasensitive PAPP-A commercializzato da Pantec; Il free-IGF-I   stato determinato con metodo immunoradiometrico - active free-IGF-I IRMA della DSL distribuito da Pantec – (ng/mL).

Risultati: A 24 ore dallo stress ipossico abbiamo osservato un significativo aumento dei livelli di PAPP-A (da 1.98 ± 2.23 a $7.34 \pm 5.95 \mu\text{UI/mL}$; $p < 0.01$) con ritorno ai valori basali a 48h ($1.60 \pm 0.67 \mu\text{UI/mL}$). L'analisi dei livelli di free-IGF-I presentava un andamento speculare rispetto ai livelli di PAPP-A con transitoria riduzione a 24h (da 0.49 ± 0.38 a $0.07 \pm 0.10 \text{ ng/mL}$; $p < 0.01$) e ritorno a livelli simili a quelli preoperatori a 48h ($0.43 \pm 0.39 \text{ ng/mL}$).

Conclusioni: Questi dati indicano che lo stress ipossico tissutale determinerebbe un transitorio aumento di PAPP-A circolante accompagnato ad una concomitante riduzione di free-IGF-I per consumo a livello del tessuto ipossico.

203**NT-proBNP: FATTORE PREDITTIVO DI FIBRILLAZIONE ATRIALE DOPO INTERVENTO DI CHIRURGIA TORACICA MAGGIORE?**

Salvatici M.¹, Cardinale D.², Passerini R.¹, Lentati P.¹, Zorzino L.¹, Cipolla C.M.², Sandri M.T.¹

¹Unità di Medicina di Laboratorio

²Unità di Cardiologia

Istituto Europeo di Oncologia, Via Ripamonti 435, 20141 Milano

Background. La fibrillazione atriale post-operatoria (FAP) dopo chirurgia toracica per neoplasia polmonare, è una complicanza ben nota e spesso responsabile di un prolungamento del tempo di ospedalizzazione e di un aumento della spesa sanitaria. La possibilità di individuare un marcatore predittivo di FAP è strategica in termini prognostici e terapeutici. Il ruolo dell'NT-proBNP in questo contesto non è mai stato indagato. Lo scopo del nostro studio è stato di valutare il potenziale utilizzo del livello pre-operatorio di NT-proBNP come marcatore predittivo di FAP.

Metodi. I valori di NT-proBNP sono stati valutati, mediante il kit Elecsys NT-proBNP Roche-Diagnostics, prima dell'intervento chirurgico per resezione di neoplasia polmonare (11 casi di pneumonectomia e 69 di lobectomia) in 80 pazienti (56 maschi, 24 femmine; età media 61±9 anni). È stato adottato un cut-off variabile in dipendenza dal sesso e dall'età dei pazienti. Tutti i pazienti ammessi allo studio erano risultati negativi alla visita cardiologica pre-operatoria per aritmia sopraventricolare, e nessuno di essi era in trattamento con farmaci antiaritmici. Nel decorso post-operatorio tutti i pazienti sono stati monitorati con sistema telemetrico per almeno 72 ore e quindi con valutazione cardiologica giornaliera fino alla dimissione.

Risultati. In 19 pazienti (24%) si è osservato un valore pre-operatorio di NT-proBNP superiore al cut-off considerato [gruppo NT-proBNP+ (n=19, 24%): 277±213 pg/ml vs gruppo NT-proBNP- (n=61, 76%): 99±85 pg/ml; P=0.01]. I pazienti che hanno presentato FAP sono stati 13 (16%): 10 (77%) appartenevano al gruppo NT-proBNP+, mentre 3 (23%) appartenevano al gruppo con NT-proBNP nella norma.

Conclusioni. L'NT-proBNP determinato prima dell'intervento chirurgico per resezione di neoplasia polmonare, potrebbe essere un marcatore predittivo di FAP, in grado di individuare pazienti nei quali instaurare un trattamento antiaritmico preventivo.

Bibliografia. Wazni O.M., Martin D.O., Marrouche N.F. et al. Plasma B-Type Natriuretic Peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation*. 2004;13:124-127.

204**VARIAZIONI DI cTnI E Nt-proBNP IN PAZIENTI CON FIBRILLAZIONE ATRIALE SOTTOPOSTI AD ISOLAMENTO ELETTRICO DI VENE POLMONARI**

Cattozzo G.¹, Carluccio G.¹, Astore S.¹, Signò P.¹, De Ponti R.², De Sanctis V.², Caravati F.², Salerno-Uriarte JA.^{1,2}, De Luca G.^{1,2}

¹A.O. Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

²Università dell'Insubria, Varese

La troponina I cardiaca (cTnI) è un marcatore di danno del miocardio. La concentrazione sierica del frammento ammino-terminale del precursore del peptide natriuretico tipo B (Nt-proBNP) aumenta per effetto della distensione della parete; essa risulta aumentata durante fibrillazione atriale (FA) e si normalizza in seguito a ripristino del ritmo sinusale. In questo lavoro abbiamo valutato le variazioni delle concentrazioni sieriche di cTnI e Nt-proBNP in pazienti affetti da FA sottoposti ad isolamento elettrico segmentale delle vene polmonari (IVP) mediante ablazione trans-catetere con radiofrequenza. Sono stati reclutati 8 pazienti (7 maschi ed una femmina di età compresa tra 34 e 74 anni) sottoposti ad IVP per il trattamento di FA idiopatica. Per 6 pazienti sono state isolate 3 vene polmonari, per 2 pazienti ne sono state isolate 2; l'intervento di IVP è stato eseguito mediante doppio approccio transsettale, con catetere mappante basket e catetere ablatore irrigato a circuito aperto con potenza massima di radiofrequenza (30 W per 45 s, temperatura di 43 °C). Per tutti i pazienti si è osservato ripristino del ritmo sinusale al termine dell'intervento. Campioni di sangue per la misura di cTnI e Nt-proBNP sono stati ottenuti 24 ore prima dell'intervento, al termine del medesimo e dopo 72 ore. La concentrazione di cTnI è stata misurata con il sistema Access 2 (Beckman-Coulter); per la determinazione di Nt-proBNP si è utilizzato il sistema Elecsys 2010 (Roche). Tutti i valori basali di cTnI erano compresi nell'intervallo di riferimento (< 0.06 mg/L); nei campioni prelevati al termine dell'intervento di IVP, cTnI era compresa tra 0.10 e 1.67 mg/L (mediana, 0.44 mg/L); in quelli prelevati 72 ore dopo l'intervento cTnI era compresa tra 0.06 e 0.83 mg/L (mediana, 0.15 mg/L). Non si osservava correlazione tra numero delle vene isolate e rilascio di cTnI (indicato dalla media dei valori misurati per ciascun paziente). I valori basali di Nt-proBNP erano compresi tra 32 e 498 ng/L (mediana, 164 ng/L), risultando nella norma per 2 pazienti (< 100 ng/L). Non vi era correlazione tra valori basali di Nt-proBNP ed età dei pazienti. Nei campioni prelevati al termine dell'intervento di IVP la concentrazione di Nt-proBNP risultava compresa tra 79 e 422 ng/L (mediana, 233 ng/L), mentre nei campioni prelevati 72 ore dopo IVP era compresa tra 57 e 399 ng/L. All'analisi statistica queste variazioni risultavano non significative (test di Wilcoxon, p > 0.05). In conclusione, i valori di cTnI erano dimostrativi di lesione tissutale, mentre i valori di Nt-proBNP non presentavano variazioni significative e permanevano elevati anche 72 ore dopo IVP, sebbene si osservasse ripristino del ritmo sinusale.

205**ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN AND PRO-BETA NATRIURETIC PEPTIDE IN PERIPHERAL ARTERY DISEASE.**

Montagnana M.¹; Lippi G.¹; Minuz P.²; Lechi C.¹; Fava C.²; Arosio E.²; Guidi G.C.¹

(1) Ist. di Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Osp. Policlinico, P.le Scuro 10, 37121 Verona; (2) Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Osp. Policlinico, P.le Scuro 10, 37121 Verona.

Cardiovascular disease is the leading cause of mortality and morbidity in western Countries. Despite its remarkable medical and social consequences, peripheral artery disease (PAD) is often underestimated among atherosclerotic disorders. Additionally, little is known so far on the behavior of conventional and emerging markers of ischemic heart disease, that should allow the reliable identification of PAD patients at higher risk of developing myocardial ischemia and heart failure or dysfunction (1). To investigate further this topic, we measured cardiac Troponin T (cTnT), creatine kinase isoenzyme MB (CK MB), Ischemia Modified Albumin (IMA) and pro-Beta Natriuretic Peptide (proBNP) in 35 consecutive patients with clinically ascertained PAD (stage 2 to 4, according to Leriche-Fontaine) and 20 healthy matched controls, displaying moderate to high cardiovascular risk, but no clinical evidence of PAD. Blood was collected in the morning on fastened subjects, who gave an informed consent for being tested. Heparinized plasma was separated by centrifugation at room temperature at 1500xg and stored at -80° C until measurement. cTnT, CK MB and proBNP were assayed on the Elecsys 2010 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), whereas IMA was determined by a colorimetric assay (ACB, Ischemia Technologies, Denver, USA) on the Modular System P (Roche Diagnostics GmbH). Main results are synthesized in table 1; values are expressed as mean±standard deviation, with the exception of cTnT and proBNP (median and distribution). Although the concentration of cTnT, CK MB and IMA was not statistically increased in PAD patients, proBNP values were substantially higher in PAD patients than in healthy controls. The percentage of PAD patients displaying values exceeding the conventional prognostic proBNP threshold (>14.8 pmol/l) was also significantly different between PAD patients and controls (74% vs 10%, p<0.001). After excluding PAD patients exceeding the 0.01 ng/ml cTnT cut-off value, indicative of current cardiac involvement (9/35, 26%), the median concentration of proBNP remained highly statistically increased (5.8 vs. 28.0 pmol/l, p<0.001). Taken together, these results indicate that proBNP values are substantially increased in PAD patients, irrespectively of acute myocardial ischemia. Therefore, we hypothesize that proBNP measurement may be useful to identify PAD patients at increased risk of developing heart failure or dysfunction. Reference:

1) Montagnana M, Lippi G, Guidi GC. New perspectives in the diagnostic approach to the acute coronary syndrome. *Recenti Prog Med* 2005;96:171-7.

	Controls	PAD	P
N.	20	35	
cTnT (ng/ml)	<0.01	0.01 (<0.01-0.06)	0.156
CK MB (ng/ml)	3.9±3.0	2.3±2.1	0.005
IMA (Kunits/l)	101±8.4	96±14	0.167
Pro-BNP (pmol/l)	5.8 (2.0-26.9)	34.7 (3.2-397.8)	0.003

206**PSA FREE TO TOTAL RATIO AND VELOCITY AS PREDICTORS OF SEXTANT BIOPSY OUTCOME**

Rubeca T., Confortini M., Ciatto S.

Centro per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, Viale A. Volta 171, 50131 Firenze

Aim: to assess if free to total (F/T) PSA ratio or PSA velocity (PSAV) may improve the specificity while keeping the sensitivity of random sextant biopsy.

Material and methods. Review of 904 consecutive sextant biopsies with negative digital rectal examination and transrectal ultrasonography. Analysis of the accuracy of biopsy indication with different PSA, F/T and PSAV cut off values.

Results. Prostate cancer was detected in 145 of 904 (16.0%) biopsies, with a benign/malignant ratio of 5.2:1. Using total PSA cutoff of 10>, or 20> ng/ml to indicate biopsy would have spared 75.4 or 92.6% of unnecessary benign biopsies while missing 51.0 or 82.7% of cancers. Using F/T cutoff of <20, or <12% to indicate biopsy would have spared 12.9 or 24.2 % of unnecessary benign biopsies while missing 11.0 or 31.0 % of cancers. Using PSAV cutoff of >0.10, >0.50, or >0.75 ng/ml/year to indicate biopsy would have spared 75.7, 84.5, or 89.8% of unnecessary benign biopsies while missing 63.4, 71.7, or 77.27% of cancers. Using different cut off values would not improve previously reported results.

Conclusions. The cut off of 4 ng/ml total PSA commonly indicating random sextant biopsy is poorly specific. Elevating total PSA cut off or selecting subjects to biopsy according to F/T or PSAV value is clinically useless, as the obtained reduction of unnecessary benign biopsies would be counterbalanced by a unacceptable drop in sensitivity.

Ciatto S, Lombardi C, Rubeca T, Zappa M. Predictors of random sextant biopsy outcome in screened men with PSA >4 ng/mL and a negative sextant biopsy at previous screening. Experience in a population based screening program in Florence. *Int J Biol Markers* 2004;19:89-92.

207**OSTEOPROTEGERIN AND RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-KAPPAB LIGAND IN THE SERUM OF BREAST CANCER PATIENTS.**

Metelli M.R., Fulceri F., Puccetti C., Manzone F., Panicucci E., Pietrini P.
Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Experimental Pathology, University of Pisa, Italy.

Osteoprotegerin (OPG) is a secretory glycoprotein that belongs to the tumor necrosis receptor family. Receptor activator of nuclear factor(NF)-kB ligand (RANKL) is the natural ligand for OPG. These new parameters are decisive factors for maintaining the balance between bone formation and resorption. Serum OPG and RANKL levels were assayed in breast cancer patients with active disease to evaluate their usefulness to recognize and monitoring alterations in bone activity and metabolism. The 20 patients aged 60 ± 15 (m \pm SD)(range 36 - 84) were under treatment for bone and multiple metastases with partial or complete response. The reference values were assessed in 18 healthy women aged 53 ± 14 (m \pm SD)(range 27-79). All determinations were performed in serum and stored -20°C until measurement. OPG and RANKL values were measured by ELISA method (Biomedica GmbH & Co KG, Wien).

The OPG levels were elevated, but not significantly, in the patients compared with controls (4.6 ± 3.1 pmol/l vs 3.4 ± 1.4 pmol/l , m \pm SD), while the RANKL levels were significantly higher in breast cancer patients than in healthy control (1.63 ± 1.42 vs 0.49 ± 0.25 pmol/l , m \pm SD; t test value = 3.475, p = 0.002).

These preliminary data show increased serum concentrations of these biochemical markers. In conclusion, long-term follow-up will be needed to improve the knowledge of these clinical meaning of these markers and to verify their usefulness in the early detection of bone metastases or the monitoring of the therapy of breast cancer patients.

Lipton A., Ali SM., et al. " Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients." Clin.Cancer Res.2002 Jul; 8(7):2306-10

208**PROGNOSTIC AND PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF HER-2 BREAST TUMOR LEVELS: COMPARISON OF DIFFERENT METHODS**

Garrubba M., Savino M., Valori V., Carella M., Murgo R., Bisceglia M., Parrella P., Maiello E., Santini S. A. IRCCS Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", Viale Cappuccini 1, 71013 San Giovanni Rotondo, (FG).

The HER-2 transmembrane tyrosine kinase is both a prognostic marker and a therapeutic target in breast cancer. Overexpression of the 185 kd HER-2 identifies more aggressive cancers that are characterized by early metastatic spread and reduced patient survival.

The purpose of this study is the comparison of three methods of assessment of HER-2 status: immunochemistry (IHC), Enzyme Immunoassay (EIA) and Real-Time Reverse Transcription- PCR in serum and peripheral blood of breast tumor patients respectively.

A total of 70 serum and peripheral blood samples, pre and post surgery, have been so far collected. Histological tissue have been analyzed by IHC, serum have been used for HER-2 receptor quantification by EIA, while peripheral blood for RNA extraction, reverse transcription and expression analysis of the HER-2/neu gene by quantitative real time PCR.

We have analyzed 50 serum sample by EIA and developed a real time quantitative reverse transcription PCR based on Light Cycler system. A panel of 20 sera from healthy blood donors were tested for sp185HER-2 by EIA. The detected sp185HER-2 levels are ≤ 15 ng/ml. Fourteen (28%) out of fifty samples tested by EIA have an increased rate of serum HER-2 > 15 ng/ml. Ten out of fourteen cases HER-2 positive were positive also for HER-2 by immunochemistry (IHC) assay showing a good correlation between the two methods. Up to date, Real Time PCR data are not sufficient to establish if there is or there is not a correlation between gene expression levels in peripheral blood and results obtained by EIA and IHC. Those preliminary data confirm that the determination of HER-2 receptor expression by EIA offers a clinically valuable alternative to semiquantitative IHC assessment of breast tumor HER-2 overexpression. Whenever Real-Time quantitative PCR should appear to be a valid innovative method for the HER-2 quantification, this approach, due to its simplicity and ability to produce rapid results, could become a valid alternative to both IHC and EIA.

209**MITOCHONDRIAL DNA (mtDNA) MUTATIONS:
NEW INSIGHTS FOR PANCREATIC CANCER
DIAGNOSIS AND PROGNOSIS.**

Fogar P.¹; Navaglia F.²; Basso D.²; Greco E.²; Sperti C.¹; Zambon C.-F.¹; Falda A.²; Stranges A.²; Pedrazzoli S.¹; Plebani M.²

Departments of ¹Medical and Surgical Sciences and of ²Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

The D-loop region is the major control site for mtDNA expression because it contains the reading strand for origin of replication and promoters for transcription. Somatic D-loop mutations have implicated in the pathogenesis of cancers. Our aims were to: 1. compare germline and pancreatic cancer (PC) mtDNA D-loop sequence; 2. verify whether in the germline mtDNA D-loop region there is any specific sequence correlated with PC diagnosis and outcome. Somatic (tumor) and germline (blood) mtDNA D-loop sequence was obtained from 24 PC and from blood of 12 age-matched healthy controls. mtDNA sequence was compared with the Cambridge sequence (www.mitomap.org). Results: Hot spot differences between tumor and germline mtDNA were found only in 3 patients. Among the numerous SNPs identified in our sequences, only 4 of them were unbalanced between PC and controls. These SNPs (CT16189, CT16519, AG73, CT152) were analysed by DHPLC in a larger series of patients, including 100 PC, 41 chronic pancreatitis, 87 controls and 19 pancreato-biliary tract tumors. The haplotype T at 16189 and C at 16224 was correlated with pancreatic adenocarcinoma in non smokers ($X^2=4.8$, $p<0.05$), but not in smokers ($X^2=0.01$, $p:ns$). In male, not in female patients with PC the mtDNA 16519 T allele was correlated with diabetes mellitus ($X^2=7.98$, $p<0.05$). PC patients without distant metastases and bearing this allele survived significantly lower (Log Rank test = 9.74, $p<0.005$). Conclusions: 1. somatic mtDNA mutations of the D-loop occur rarely in PC; 2. T16189-C16224 haplotype enhances PC risk in the absence of cigarette carcinogens exposure; 3. mtDNA 16519 T allele favors the onset of diabetes mellitus in PC supporting the role of mitochondria in the pathogenesis of this metabolic alteration; 4. the role of this allele in worsening metabolism is probably the basis of its association with a worse prognosis in non metastatic PC.

P. Fernandez-Silva, J.A. Enriquez, J. Montoya. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology* 2003;88.1:41-56.

210**ISOFORME DEGLI ANTIGENI PROSTATICI:
RELAZIONE TRA I DIFFERENTI VALORI.
ASPETTI EPIDEMIOLOGICI E STATISTICI**

Cirillo G.*; Di Giorgio G.**; Urbani G.**

*Laboratorio Patologia Clinica P.O.

S. Spirito Pescara

** Laboratorio Patologia Clinica P.O.

“ G. Mazzini “ Teramo

Introduzione: L'incidenza media europea della neoplasia prostatica, tumore che frequentemente affligge il sesso maschile, è 55/100.000 con una mortalità di 22,6 decessi su 100.000 individui. Oltre alla razza e all'origine geografica, altri fattori di rischio sono l'età, la familiarità, l'alimentazione, elevati valori di testosterone e affezioni prostatiche di origine infiammatoria cronica. E' quindi utile avere a disposizione tecniche che permettano con basso costo, di riconoscere e monitorare il carcinoma prostatico. Lo scopo del presente lavoro è quello di comparare due metodiche esistenti in commercio, di verificarne la concordanza, la specificità e la sensibilità in rapporto allo screening del carcinoma prostatico, alla diagnosi precoce e al follow up dei pazienti.

Metodi: I kit sono stati forniti da ditte certificate dalla F.D.A.. La prima ditta ha fornito un sistema per il dosaggio tPSA e del fPSA. La seconda ha fornito un sistema per il dosaggio del tPSA e del cPSA. Le determinazioni vengono effettuate in chemiluminescenza. Lo studio è randomizzato l'età dei pazienti compresa tra 45 e 90 anni.

Risultati: I risultati sono stati analizzati con tecniche statistiche usuali, includendo media, deviazione standard, calcolo del coefficiente di correlazione, Test di Passing & Bablok e test di Student per i dati appaiati per la significatività delle differenze tra i valori medi.

La concordanza dei campioni esaminati con le due metodiche è del 100% per i negativi; del 93% per i tPSA positivi; del 84% per i complessati. Non c'è concordanza per la determinazione dei fPSA.

Conclusioni: E' consigliabile eseguire tali determinazioni con la stessa metodica perchè la standardizzazione dei valori di PSA è difficoltosa. Il cancro della prostata può restare silente per anni. Per l'impatto psicologico che tale determinazione ha sul paziente, è auspicabile non utilizzare il dosaggio del PSA nello screening del carcinoma prostatico, mentre utile è l'impiego nel follow up.

211**VALUTAZIONE DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA MOLECOLARE NEL MELANOMA**

Rapanotti MC.¹, Bernardini S.¹, Ballerini S.¹, Bellincampi L.¹, Infantino M.¹, Iori R.¹, Valentini A.¹, Federici G.¹

¹Dip. Medicina Interna e Medicina di Laboratorio-PTV, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

²Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS-Roma

Scopi: Il melanoma è noto essere un tumore estremamente eterogeneo per le sue proprietà biologiche, antigeniche, e metastatiche. Criteri principali per stabilire la prognosi nel melanoma sono le caratteristiche istologiche del tumore primario, la presentazione clinica e la compromissione linfonodale. Malgrado l'uso di tali parametri sia di grande ausilio per i clinici, la precoce identificazione di cellule circolanti tumorali (CTCs) nel sistema portale e/o linfatico potrebbe permettere di definire meglio la diagnosi, la prognosi e quindi una corretta valutazione della Malattia Minima Residua (MMR) (1). A tale scopo abbiamo deciso di ricercare CTCs di melanoma nel SVP, mediante l'analisi con RT-PCR di 5 diversi marcatori "tumore specifici" la tirosina idrossilasi (TyrOH), Mage-3, P97, MART-1, e MUC 18, detti anche melanoma associated antigens (MAAs).

Metodologia: L'RT-nestedPCR è stata eseguita sull'mRNA estratto dal SVP di 56 pazienti affetti da melanoma. La metodica presenta una sensibilità di 1-10 cellule di melanoma diluite su 5-10x10⁶ cells di SVP.

Risultati: 10 pazienti su 56 hanno presentato una positività per 1 o più marcatori. In tutti i 10 casi risultati positivi si è documentata l'amplificazione della TyrOH; Quattro dei 10 pazienti inoltre coesprimevano inoltre MART1-1; due dei 10 risultavano positivi MAGE-3, o per p97. Analizzando più dettagliatamente i dati ottenuti, si è evidenziata la contemporanea positività di 3-5 MAAs solo ed esclusivamente sui casi con prognosi sfavorevole, (III-IV stadio). In tali casi inoltre si è evidenziata la positività per MUC-18, marker d'angiogenesi, caratterizzante quindi le forme in progressione di malattia. Negli altri sette casi (stadio I-II) solamente 1 o al massimo due markers si presentavano contemporaneamente, uno dei quali sempre la TyrOH.

Conclusioni: Scopo del nostro lavoro è stato quello di sviluppare una tecnica assai sensibile e specifica volta a identificare la presenza di CTCs anche in pazienti affetti da melanoma non metastatico. La positività del solo marcatore TyrOH non risulta essere specifica, e il suo valore prognostico non è chiaramente compreso, mentre la positività contemporanea di più MAAs, almeno 3, si associa solamente agli stadi più avanzati di malattia. Questo approccio metodologico pensiamo possa essere di ausilio per meglio caratterizzare la diagnosi ed la MMR dei pazienti affetti da melanoma.

1) Hoon DSB., Wang Y., Dale PS. *et al* (1995) "Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-markers polymerase chain reaction assay". *J of Clin Oncol*, 13-8:2109-2116

212**ISSET OF CIRCULATING TUMOR CELLS AND MOLECULAR ANALYSIS AFTER LASER MICRODISSECTION IN BREAST CANCER**

¹ Malentacchi F.; ¹ Simi L.; ¹ Orlando C.; ¹ Salvadori B.; ² Bianchi S.; ³ Distante V.; ¹ Pazzagli M.; ¹ Pinzani P.

¹ Clinical Biochemistry Unit, Department of Clinical Physiopathology, Viale Pieraccini 6 50139 Florence ² Department of Human Pathology and Oncology, and ³ Department of Surgery University of Florence, Florence, Italy.

Purpose: The aim of this study is the counting and the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells (CTCs) (1) by Isolation by Size of Epithelial Tumor cells (ISET) method in the peripheral blood of breast cancer patients. An evaluation of the ability of the method to evidence the presence of occult carcinoma cells in early breast cancer patients was performed and the results compared to those obtained by quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay for the evaluation of cytokeratine 19 (CK-19) mRNA expression. The feasibility of molecular analysis of CTCs after laser microdissection of filters used by ISET was illustrated, referring to HER-2 amplification.

Experimental design: Blood samples drawn from 44 patients with early breast cancer preoperatively were analysed by ISET. From the same samples, total RNA was extracted and submitted to quantitative real-time RT-PCR for the detection of CK-19 mRNA positive cells by Taqman Technology. HER-2 degree of amplification was measured by real-time PCR on DNA extracted from cells recovered by laser microdissection from 7 selected ISET positive filters.

Results: 12 out of 44 (27%) samples showed the presence of epithelial cells on filter. A statistically significant agreement (p=0.001) was observed between real-time RT-PCR results and those obtained by ISET on samples drawn before surgery. As regard to HER-2 amplification, good correspondence was found between results obtained from microdissected CTCs and those obtained using DNA extracted from the primary tumor as well as with the immunohistochemistry results.

Conclusion: ISET method allows the collection of breast carcinoma cells by filtration despite of their smaller dimension relatively to other carcinoma cell types. The sensitivity and specificity of the method is comparable to those obtained by quantitative real-time RT-PCR assay for the evaluation of CK-19 mRNA expression. Moreover, laser microdissection technique allows the recovery of nucleic acids for further molecular analysis and CTCs characterization. I Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, Meropol NJ, Weiner LM, Cohen SJ, Moreno JG, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2005 ;65(12):4993-7.

213

MOLECULAR MECHANISMS ELICITED BY MICRONUTRIENTS IN HUMAN PROSTATE CARCINOMA CELLS

Scifo C.*; Cardile V.°; Russo A.*; Renis M.*

* Department of Biological Chemistry, Medicinal Chemistry and Molecular Biology, ° Department of Physiological Sciences, * ° V.le A. Doria 6, University of Catania, 95125 Catania (ITALY)

Cancer, after heart diseases, is the second leading cause of deaths; in particular prostate carcinoma represents in men the most commonly diagnosed type of tumour and the second cause of death from cancer. It is characterised by a first early phase in which tumoral progression may be stopped/reduced by hormonal androgenic treatment and by a second very aggressive later phase in which clones hormone-refractory are present.

In the present study the effects of two micronutrients were tested: resveratrol (200 µM), and propolis ethanolic extract (100 µg/ml). The substances were added to androgen responsive (LNCaP) and androgen-resistant prostate cancer cells (DU145). A comparison with the activity of vinorelbine bitartrate (Navelbine®), a semi-synthetic drug of clinical use, was made. Several biochemical parameters were tested such as cell viability (MTT assay), cell membrane integrity (LDH release), cell redox status (nitric oxide formation, Reactive Oxygen Species production, reduced glutathione levels), genomic DNA fragmentation (COMET assay), presence of apoptotic DNA damage (TUNEL test) and mitochondrial transmembrane potential alteration ($\Delta\psi$). Morphological analysis (SEM and TEM) and immunoblotting evaluation of the expression of HSP27, HSP70, p21 and p53 have been also performed.

Our results, together with providing a scheme of the possible molecular mechanisms activated, indicate the two micronutrients, either alone or in combination with Navelbine, as promising molecules for the therapy of prostate carcinoma, encouraging the development of *in vivo* studies aimed to check the actual feasibility of this kind of therapy.

Acknowledgements: Authors wish to thank Dr. F. Sinatra and Dr. A. Milasi, Dept. Animal Biology (Univ. Catania), for the TEM and SEM analysis. Moreover they are very grateful to Dr. C. Vancheri and Dr. M. Caruso, Dept. Internal and Specialistic Medicine (Univ. Catania), for the flow cytometry analysis.

214

SDHD MUTATIONS IN PATIENTS AFFECTED BY NCD TUMORS

Simi L.⁵, Vinci S.⁵, Ercolino T.¹, Becherini L.¹, Sestini R.², Gensini F.², Ferruzzi P.¹, Gaglianò M. S.¹, Guerrini L.³, Pratesi C.⁴, Pinzani P.⁵, Pazzagli M.⁵; Orlando C.⁵, Mannelli M.¹

Sezioni di ¹Endocrinologia, ²Genetica Medica, ³Radiologia e ⁴Biochimica Clinica, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze. Sezione di Chirurgia Vascolare, Dipartimento di Clinica Medica Chirurgica, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

Il complesso mitocondriale di tipo II della catena respiratoria (succinato:ubiquinone ossidoreduttasi) è l'unico interamente codificato da geni nucleari ed è costituito da quattro subunità: SDHA, SDHB, SDHC e SDHD. Mentre le subunità A e B costituiscono la componente idrofila e catalitica del complesso, C e D sono proteine idrofobiche integrali di membrana che ancorano la subunità catalitica alle creste mitocondriali. Negli ultimi anni è stato evidenziato che mutazioni a carico di questo complesso enzimatico, e in particolare del gene SDHD, sono frequentemente coinvolte nello sviluppo dei tumori che derivano dalla cresta neurale (NCD).

In questo studio è stata effettuata l'analisi di sequenziamento per SDHD, mediante la chimica dei Big Dye Terminator con ABIPrism 310 (Applied Biosystems) nel DNA estratto da leucociti di pazienti affetti da tumori NCD. Una mutazione germinale nonsense in eterozigosi (Q109X) è stata individuata in sei pazienti affetti appartenenti a famiglie toscane non imparentate tra loro. A oggi 43 soggetti (20 femmine e 23 maschi) eterozigoti sono stati individuati e successivamente valutati per la presenza di tumori NCD mediante esami radiologici e misurazione delle metanefrine urinarie e della cromogranina plasmatica. E' stata inoltre effettuata l'analisi dei microsatelliti che ha evidenziato un aplotipo comune per tutti i soggetti portatori della mutazione Q109X confermando la presenza di un effetto fondatore. L'analisi genetica condotta su DNA estratto da cellule tumorali isolate mediante microdissezione laser ha permesso di individuare in tali cellule la perdita di eterozigosi (LOH). Tutti i pazienti affetti mostrano un'ampia variabilità fenotipica con presenza di tumori glomici mono e bilaterali associati o meno a paragangliomi e feocromocitomi. In una delle stesse famiglie è stata individuata una variante missense T112I che segrega indipendentemente da Q109X. Inoltre, in due sorelle affette da paraganglioma bilaterale è stata descritta una mutazione G106D, mai descritta precedentemente, che coinvolge un aminoacido altamente conservato. Infine, in una famiglia è stata individuata una mutazione P81L, precedentemente descritta in una casistica americana, associata a paraganglioma vagale.

Questo studio evidenzia come gran parte dei tumori NCD familiari, non associate a mutazioni sui geni VHL e RET in una area del Centro Italia, sono causati da una singola mutazione con effetto fondatore. Si conferma inoltre l'estrema importanza del test genetico per il gene SDH e in particolare SDHD, nei soggetti che presentano tumori NCD multipli e ricorrenti.

1Pawlu C, Bausch B, Neumann HP. Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Fam Cancer*. 2005;4(1):49-54.

215**DOSAGGIO DI MARCATORI TUMORALI NEL FLUIDO DI LESIONI CISTICHE DEL PANCREAS**

Falliti G., Miceli D., Salemi V., Leticia G., Sorrentino M.
Laboratorio Analisi – Istituto Mediterraneo Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), Palermo

Introduzione. Le pseudocisti infiammatorie costituiscono la maggioranza delle lesioni cistiche del pancreas e occorre, pertanto, indicare dei criteri laboratoristici utili per giungere ad una diagnosi differenziale delle neoplasie cistiche che rappresentano meno del 10% delle neoplasie pancreatiche. Questi tumori pancreatici sono: cistoadenomi sierici (32-39% delle neoplasie cistiche); neoplasie cistiche mucinose (10-45%); neoplasie mucinose papillari intraduttali (21-33%); neoplasie solide pseudopapillari (< 10%); neoplasie cistiche endocrine (< 10%); adenocarcinomi duttali con degenerazione cistica (< 1%); cistoadenocarcinoma acino-cellulare (< 1%). L'Organizzazione Mondiale della Sanità descrive 3 stadi di queste neoplasie: benigne (adenomatose), a basso grado di malignità (borderline) e maligne (ca in situ e ca invasivo). Quando non è possibile giungere ad una diagnosi certa con la diagnostica per immagini, le analisi citoistologica e biochimica del fluido cistico possono dare informazioni aggiuntive.

Metodi. Sono stati dosati in chemiluminescenza (Immulate. Medical Systems) diversi Marcatori tumorali (CA 19-9; CEA; AFP; CA 15-3; CA 125) nel fluido di lesioni cistiche del pancreas di 30 pazienti, ottenuto per agoaspirazione per via endoscopica o nel momento stesso della exeresi chirurgica, e confrontati i risultati con l'esame citoistologico laddove fosse sufficiente il fluido prelevato.

Risultati. Solo nel 60% dei casi è stato possibile ottenere materiale per l'esame citologico. Solo nel 45% dei campioni si è avuto un quantitativo di materiale soddisfacente per l'interpretazione citoistologica. Solo nel 10% dei casi l'esame citoistologico ha consentito una diagnosi certa di lesione maligna. Nel 60% dei casi solo il marcatore Ca 19-9 ha mostrato valori elevatissimi con dati concordanti con il risultato dell'esame citoistologico.

Conclusioni. C'è uniformità di consenso sul fatto che la diagnostica per immagini da sola (TC, RMN, ECO) non sia sufficiente per consentire una diagnosi clinicamente utile e certa in presenza di lesioni cistiche pancreatiche. Il dosaggio dei Marcatori tumorali nel fluido cistico ha dato informazioni aggiuntive in combinazione con l'analisi citoistologica con un elevato indice predittivo positivo. Sembra opportuno ed utile che possa essere adottato un diagramma di flusso, comprendente sia l'analisi citoistologica che biochimica, in aggiunta alla diagnostica per immagini, per adottare criteri clinici validi per giungere a diagnosi certe.

Bibliografia. Brugge W.R., et al., N.Engl.J.Med., 351,1218,2004; Brugge W.R., et al., Gastr. End. 59, 698,2004

216**VALORI FALSAMENTE ELEVATI DI CEA E CA 19.9 IN UN PAZIENTE CON EPATITE CRONICA ATTIVA**

Baroni S., Carrozza C., Di Stasio E., Agostinelli G., Zagarella R., Zuppi C., Giardina B.
Ist. Biochimica e Biochimica Clinica- U.C.S.C.- L.go F. Vito,1 00168- Roma

Descriviamo il caso di un paziente ambulatoriale al quale era stato richiesto il dosaggio del CEA e del Ca 19-9. I dosaggi eseguiti su siero con reattivi Abbott per Architect analyzer risultavano: CEA 42.74 ng/ml e Ca 19-9 > 500.0 U/ml; dopo diluizione 1:10 il Ca 19-9 era < 20.0 U/ml. Abbiamo sospettato un'interferenza analitica nel campione e per verificarla abbiamo:

1. ripetuto il CEA dopo diluiz 1:10 → 5.79 ng/ml.
2. dosato CEA e Ca 19-9 dopo diluizioni scalari del siero per meglio valutare l'interferenza → assenza di linearità
3. trattato il siero con PEG 6000 → CEA e Ca 19-9 sul sovrantante erano inferiori alla sensibilità analitica.
4. ricercata interferenza in altri dosaggi immunometrici (ormoni e markers tumorali) su siero come tale e diluito → la linearità era mantenuta.
5. ripetuto i dosaggi con reattivi di diversa ditta produttrice → i risultati sul siero come tale, erano completamente diversi da quelli ottenuti con kit Abbott: CEA 1.76 ng/ml e Ca 19-9 8.59 U/ml

Si trattava di un paziente con epatite cronica attiva dal 2003 e recente intervento per polipo intestinale, istologico negativo. Dosaggi del CEA effettuati in diversi laboratori risultavano notevolmente diversi; gli era stato quindi richiesto anche il dosaggio del Ca 19-9. Riteniamo che il paziente abbia eteroanticorpi in grado di interferire con alcuni immunodosaggi; abbiamo infatti evidenziato tracce di crioglobuline e componenti monoclonale IgM k e oligoclonale IgG k.

L'interferenza da anticorpi rimane un problema subdolo ed insidioso che richiede la massima attenzione da parte delle case produttrici di reattivi, del clinico e del laboratorista per evitare risultati erronei ed allarmanti soprattutto nel caso di marcatori tumorali. Risultati di laboratorio particolari o che non rispecchino le informazioni cliniche devono essere campanello di allarme di una possibile interferenza.

Grazie al risultato iniziale del Ca 19-9, superiore alla linearità prevista dal metodo ed a quello totalmente disatteso dopo diluizione, ci è stato possibile sospettare l'interferenza e confermarla anche sul CEA. Avremmo altrimenti erroneamente refertato CEA significativamente patologico, con importanti conseguenze nel follow up del paziente.

Preissner CM, Dodge LA, O'Kane DJ, Grebe SK. Prevalence of heterophilic antibody interference in eight automated tumor marker immunoassays. 2005; 51:208-210.

217

CONFRONTO FRA QUATTRO DIVERSI METODI DI DETERMINAZIONE DEL CA 19-9

Sandri M. T.¹, Passerini R.¹, Chierigatti I.², Dolci A.²

¹ Unità di Medicina di Laboratorio, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

² Dipartimento di Patologia, MultiMedica, Milano

Introduzione. L'antigene carboidratico Ca 19-9, un oligosaccaride biochimicamente correlato all'antigene di gruppo sanguigno Lewis A (BG-5, Le^a), è un marcatore tumorale usato di frequente nell'adenocarcinoma del pancreas e dello stomaco, in un gran numero di tumori del colon e della colecisti e circa nella metà dei tumori ovarici primari e metastatici.

In questo studio abbiamo messo a confronto i risultati ottenuti con quattro sistemi analitici utilizzati nella routine per la sua determinazione: Architect I 2000 e AxSYM di Abbott Laboratories, Elecsys 1010 di Roche Diagnostics e KRYPTOR di Brahms Diagnostics.

Metodi. Sono stati testati 81 campioni clinici con valori di Ca 19-9 distribuiti tra livelli bassi, medi ed alti. Per l'analisi statistica abbiamo utilizzato la regressione di Passing - Bablok e il diagramma differenziale secondo Bland Altman.

Il limite superiore dell'intervallo di riferimento è 37 kU/L. con Axsym, Architect e Kryptor, 39 kU/L con Elecsys 1010.

Risultati. La regressione di Passing Bablok presenta coefficienti di correlazione compresi fra 0.9586 (Architect-Elecsys) e 0.9994 (AxSYM-Elecsys), intercetta compresa fra 1.354 (AxSYM-Architect) e 12.0971 (Architect-Kryptor) e slope compresa fra 0.6426 (Architect-Kryptor) e 1.1796 (AxSYM-Architect). Secondo il diagramma di Bland Altman le differenze medie fra i sistemi analitici risultano comprese fra 11.5 (AxSYM-Elecsys) e - 88 (Kryptor-Architect),

Conclusioni. I dati della regressione di Passing Bablok mostrano una significativa differenza sistematica tra sistemi analitici; i diagrammi di Bland Altman suggeriscono la presenza di differenze significative tra i singoli campioni, soprattutto nella regione delle alte concentrazioni. Tali risultati inoltre confermano che è necessario e auspicabile lo sviluppo di uno standard di riferimento in modo da rendere i metodi più comparabili. Fino ad allora è opportuno che i pazienti vengano monitorati utilizzando sempre lo stesso metodo.

Bibliografia. Stern P. e coll. Comparison of different immunoassays for CA 19-9. Clin Chem Lab Med. 2001;39:1278-82

218

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI RETICOLOCITARI DI ATLETI DI ÉLITE CON COULTER LH750

Banfi G^{1,5}, Mauri C², Morelli B³, Di Gaetano N⁴, Malgeri U⁴, Melegati G¹

¹Istituto Galeazzi, Milano, ²Scuola di Specialità in Medicina dello Sport, Milano, ³Centro Immunotrasfusionale, AO Legnano, ⁴Instrumentation Laboratory, Milano, ⁵Facoltà di Scienze Motorie, Milano

La valutazione e la conta dei reticolociti sono importanti in medicina dello sport per un giudizio sullo stato ematologico dell'atleta e per la prevenzione dell'uso di sostanze stimolanti la maturazione degli eritrociti. La possibilità di utilizzare strumentazioni automatiche per la valutazione e la conta ha determinato una profonda modificazione dell'uso e della diffusione di tali esami, aumentando nel contempo la precisione e l'affidabilità del dato. Occorre tuttavia definire la comparabilità dei dati tra strumentazioni e metodologie differenti, per non incorrere in interpretazioni non corrette o fuorvianti, specialmente nell'ambito della prevenzione dell'emodoping e stabilire i valori di riferimento dei parametri come IRF e MRV, sia nella popolazione generale sia nella popolazione degli sportivi.

Abbiamo effettuato una valutazione dei parametri reticolocitari ottenuti con strumentazione LH Coulter su una serie di 77 atleti di élite di sesso maschile (nazionali di rugby, nazionali di sci, calciatori di serie B). La comparazione dei valori di riferimento per reticolociti, IRF, MRV con una popolazione maschile sedentaria dello stesso range di età (n= 32; 20-40 anni) non ha fornito variazioni significative. Nello specifico, i reticolociti presentavano una media di 0.91% negli atleti (range, statistica nonparametrica Pearson 0.95: 0.35-1.59) e una media di 0.93 (range 0.42-1.83) nei sedentari. L'MRV presentava una media di 101.7 (range con distribuzione normale: 93.9-109.5) negli atleti e valori corrispondenti di 101.5 (91.2-111.7) nel gruppo di controllo. Anche l'IRF era comparabile, a differenza di nostre precedenti osservazioni: la media degli atleti era di 0.28 (range, statistica nonparametrica Pearson: 0.19-0.39), mentre il valore medio dei controlli era di 0.31 con un range 0.17-0.42.

Si pone quindi l'accento sull'affidabilità della strumentazione automatica Coulter nella valutazione dei parametri reticolocitari negli atleti, soprattutto a fine preventivo per lo studio del comportamento della maturazione degli eritrociti.

219**EVALUATION OF TRANSFERRIN SOLUBLE RECEPTOR IN NO ELITE FEMALE ATHLETES**

Casabellata G.¹, Di Santolo M.¹, Lerussi A.¹, Lombardo C.¹, Stel G.², Gonano F.², Cauci S.¹

¹Dept. Biomedical Sciences and Technologies; ²Dept. Experimental and Clinical Pathology and Medicine, University of Udine, Udine, Italy.

Background: Body level of iron stores is affected both of dietary intake and by the physiological need for erythropoiesis [1]. Iron deficit is a common risk for athletes: it is mainly due to an intravascular haemolysis induced by mechanical red blood cell breaking during physical exercise. Female athletes in fertile age are much more likely than male athletes to have iron depletion. The transferrin soluble receptor is considered the earliest, reliable marker of iron availability for metabolism. Scanty data are currently available on sTfR and iron deficit in no elite athletes.

Aim: The aim of this study was to evaluate the frequency of high values and the clinical efficiency of sTfR in the diagnosis of iron deficit in no elite Italian female athletes.

Methods: Samples of venous blood were collected from ninety-three non competitive Italian athletes performing more than 8 hours exercise per week. We obtained complete hematogram results including reticulocytes, and biochemical markers of blood cell metabolism (ferritin, transferrin, % transferrin saturation, folate). Serum levels of sTfR were measured using a nephelometric immunoassay kit (Dade Behring).

Results: Elevated sTfR levels ($\geq 1,7\text{mg/L}$) were recorded in 25 subjects (27%). A significant positive correlation was found between sTfR and the transferrin. The sTfR increased significantly with decreased values of ferritin, MCV, MCH, sideremia, and % transferrin saturation.

Conclusions: Our study confirms that sTfR is a good early marker for diagnosis of iron deficit in no elite female athletes.

Reference: [1] Casabellata G., Savonitto M.M., Guatto E., Di Santolo M., Cauci S. Alimentary habits and iron deficit in no elite female athletes. *Biochimica Clinica*, 2004, vol. 28, p. 168.

220**SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DELLA ALFA2 MACROGLOBULINA NELLE URINE**

Muratore M.T.^{*}, Neri C.^{*}, Meschini R.^{*}, Ranalli T.[♦], Maurelli S.[♥], Feriozzi S.[▲]

^{*}Laboratorio Analisi [♦]Anatomia Patologica [♥]Urologia [▲]Nefrologia e Dialisi, Ospedale Belcolle, ASL Viterbo

L'alfa 2 macroglobulina ($\alpha_2\text{m}$) è una proteina di elevato peso molecolare la cui presenza nelle urine è stata fino ad oggi ritenuta marker di ematuria e proteinuria post renale. Recentemente è stata ipotizzata come marker anche in casi di proteinuria ed ematuria in corso di glomerulonefrite con rimaneggiamento della membrana basale dei capillari glomerulari (MBG)

Si è voluto valutare il reale ruolo diagnostico della $\alpha_2\text{m}$ in corso di nefropatie associate ad ematuria e proteinuria. Sono stati selezionati 3 gruppi di pazienti con ematuria macro e/o microscopica: G1, pazienti con neoplasie delle vie urinarie; G2, pazienti con glomerulonefrite (GNF) mesangiale, biotticamente accertata e non associata ad alterazioni della MBG: nefropatia IgA classe I-II; G3, pazienti con diagnosi istologica di GNF associata a rimaneggiamento della membrana basale glomerulare (GNF membranosa e membranoproliferativa.)

Il frammento di biopsia renale, contenente almeno 10 glomeruli, è stato studiato in tutti i casi con microscopia ottica ed immunofluorescenza (su tessuto congelato) ed in casi selezionati è stata eseguita anche l'indagine al microscopio elettronico.

Le urine di ogni paziente sono state esaminate almeno su tre campioni diversi a distanza di circa 5 giorni. La proteinuria totale è stata valutata con test di precipitazione con acido tricloroacetico al 20%; l' $\alpha_2\text{m}$ con metodo immunonefelometrico. In ogni caso è stato associato l'esame standard delle urine per validare la presenza di ematuria.

Il gruppo G1 comprendeva 10 pz di età media 77 anni (range 67-81), 6 con neoplasie uroepiteliali e 3 con neoplasie prostatiche; proteinuria media 2357 mg/l (range 590-6920); l' $\alpha_2\text{m}$ era presente in 8 pz. su 10, valore medio 24,11 mg/l (range 9,2 -52,9). Il gruppo G2 comprendeva 19 pz di età media 40 anni (range 17-60), con nefropatia IgA, proteinuria media 620 mg/l (range 0,1-2000 mg/l); l' $\alpha_2\text{m}$ non era mai presente (0/19 casi). Il gruppo G3 comprendeva 17 pz. (12 con GNF membranosa e 5 con GNF membranoproliferativa) di età media 63 anni (range 35-78), proteinuria media 5100 mg/l (range 200-16000), l' $\alpha_2\text{m}$ era presente in 14 su 17 pz, valore medio 9 mg/l (range 3-22)

La $\alpha_2\text{m}$ era sempre assente nei casi di nefropatia IgA (G2) in cui pur essendoci sempre presente ematuria le lesioni istologiche sono limitate al mesangio, mentre si osservava nelle urine dei casi sia di neoplasie delle vie urinarie (G1), che di GNF con alterazione della MBG (G3). Pertanto la presenza di $\alpha_2\text{m}$ nelle urine è sicuramente associata ad ematuria, ma non necessariamente di origine post renale. L' $\alpha_2\text{m}$ è infatti non solo in grado di raggiungere le urine per perdite ematiche lungo le vie urinarie (ematuria e proteinuria post renale) ma anche per grave rimaneggiamento della MBG (ematuria e proteinuria renale).

Bibliografia: D'Amico G. *Kidney International* 2003

221

INDICATORI BIOCHIMICI ED OSTEOARTROSI
EROSIVA DELLA MANO

Bernardi D., Liverani A., Ramonda R.*, Punzi L.*, Plebani M.

Servizio di Medicina di Laboratorio, *Divisione di Reumatologia, Università di Padova

L'osteoartrite erosiva (OAE) è ritenuta una variante poco comune dell'osteoartrite (OA) della mano che interessa le articolazioni interfalangee delle mani soprattutto di donne di media età, ha un decorso spesso aggressivo ed è frequentemente accompagnata da un lieve rialzo degli indici sierici di infiammazione. La diagnosi è definita dai tipici aspetti radiografici di erosione delle superfici articolari. Sono attualmente scarse le informazioni sull'utilità di indicatori biochimici nell'approfondimento dei meccanismi coinvolti nell'evoluzione delle forme di OA più aggressive.

Sono state, pertanto, determinate le concentrazioni sieriche di proteina C reattiva mediante un metodo immunonefelometrico ad elevata sensibilità (PCRus) su analizzatore BNII (Dade Behring, Milano, Italia) e le concentrazioni dei recettori solubili di TNF (rsTNF 60kDa e 80kDa) e di YKL-40 mediante metodi immunoenzimatici (Bender MedSystems, Prodotti Gianni, Milano, Italia; Metra, Quidel Corporation, San Diego, California)). Sono stati esaminati i campioni di siero di 44 pazienti con diagnosi di artrosi erosiva (18 femmine, 5 maschi; età media 61 anni) e non erosiva (20 femmine, 1 maschio; età media 52 anni) classificata secondo i criteri di Altman. Lo *score radiografico* (75 ± 11.6 OAE; 26 ± 3.2 OA) viene definito secondo la scala di Kallman, il *numero di articolazioni colpite* (12 ± 1 OAE; 7 ± 1 OA) mediante scintigrafia ossea con ^{99}Tc metilene disfosfonato. Soltanto PCRus presenta una differenza statisticamente significativa ($p=0.001$) tra i due gruppi (6.5 ± 1.09 OAE; 2.7 ± 0.6 OA) e dimostra di correlare significativamente ($p=0.03$) con l'attività della malattia (numero articolazioni colpite) oltre che con il grado radiologico ($p=0.007$) in entrambi i gruppi. Nel gruppo delle OAE rsTNF 60kDa correla significativamente ($p=0.04$) con il grado radiologico e la gravità della patologia (numero di erosioni) e YKL-40 ($p=0.02$) con il grado radiologico. rsTNF 80kDa non correla con nessun dato clinico in entrambi i gruppi.

Nel nostro studio PCRus si conferma un indicatore dell'attività infiammatoria che è molto più marcata nell'OAE. rsTNF 60kDa e YKL-40, correlando con il grado radiologico soltanto nel gruppo OAE, potrebbero consentire l'approfondimento dei meccanismi patogenetici che distinguono OAE e OA.

Altman RD, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 1990;33:1601-10.

222

LE GLICOIDROLASI DEGLI ERITROCITI NELLA
COMPRESIONE DELL'INVECCHIAMENTO
ACCELERATO DEI SOGGETTI DOWN.

Baquero Herrera C.J.^a, Massaccesi M.^a, Corsi M.M.^b, Tringali C.^a, Venerando B.^a, Lombardo A.^a and Goi G.^a
^a Dipartimento di Chimica, Biochimica e biotecnologie per la Medicina, Università di Milano, Italia.

^b Istituto di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano, Italia.

Scopo. La Sindrome di Down è caratterizzata da una fisiopatologia associata ai processi di invecchiamento ed è considerata un modello di senescenza precoce e/o accelerata. L'ipotesi che lo stress ossidativo sia la causa dell'accelerata senescenza dei soggetti Down è supportata dalle riscontrate alterazioni di alcune caratteristiche degli eritrociti evidenti in questi soggetti. Studi recenti, su eritrociti di differenti età, hanno dimostrato che alcune glicoidrolasi possono rappresentare un utile e precoce strumento per valutare i processi di invecchiamento (Goi, 2005).

Metodi. Alcune glicoidrolasi eritrocitarie, la fluidità della membrana eritrocitaria, gli idroperossidi plasmatici e le difese antiossidanti plasmatiche totali sono state studiate in 23 soggetti Down e comparate con soggetti di controllo della stessa età e con anziani sani.

Risultati. Per quanto riguarda gli idroperossidi plasmatici, le difese antiossidanti plasmatiche totali e la fluidità di membrana, i soggetti Down assomigliano più ai controlli della stessa età che agli anziani. Per quanto riguarda le glicoidrolasi di membrana i soggetti Down presentano un comportamento condiviso in parte dai controlli e in parte dagli anziani. Particolarmente interessante è la diminuzione della esosaminidasi e della N-acetil- β -D-glucosaminidasi citosoliche, quest'ultima specifica per l'idrolisi di residui O-glicosilati di GlcNAc alle proteine. Durante l'invecchiamento dell'eritrocita si osserva un regolare decremento delle glicoidrolasi citosoliche e di membrana sia nei soggetti Down sia nei controlli. Sono stati riscontrati elevati livelli di glicoidrolasi nel plasma dei soggetti Down attribuibili ad alterazioni dei meccanismi di release-uptake indotti dalle elevate concentrazioni degli idroperossidi plasmatici.

Conclusioni. Le nostre osservazioni evidenziano che i processi di invecchiamento eritrocitario dei soggetti Down sono parzialmente differenti da quelli dei due gruppi di controlli. L'accelerata senescenza presente in questi soggetti non è comparabile con quella fisiologica. Uno studio simile effettuato su soggetti con la patologia di Alzheimer, nella quale sono state evidenziate alterazioni eritrocitarie simili a quelle dei soggetti Down, potrà chiarire se i due processi di invecchiamento precoce condividono le stesse alterazioni biochimiche eritrocitarie.

Goi G. et al., *Experimental Gerontology*, 40 (2005) 219-225.

223

PERFORMANCE DIAGNOSTICA DEL TEST QUANTITATIVO PER LE CATENE LEGGERE LIBERE CIRCOLANTI NELL'AMILOIDOSI AL.

¹Russo P., ¹Palladini G., ¹Lavatelli F., ²Bosoni T., ¹Casarini S., ¹Zorzoli I., ³Melzi D'Eril G.V., ²Moratti R., ^{1,2}Merlini G.

¹Centro per lo Studio delle Amiloidosi – Lab. di Biotecnologie e ²Lab. di Chimica Clinica, IRCCS S. Matteo e Università di Pavia; ³Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università di Milano.

La diagnosi di amiloidosi richiede la documentazione istologica dei depositi di amiloide e la dimostrazione del clone plasmacellulare. Questa si ottiene principalmente individuando le catene leggere monoclonali nel siero e/o nelle urine. Recentemente, è stato proposto di impiegare a questo fine un test quantitativo per le catene leggere libere circolanti (FLC).¹

Materiali e metodi. In 123 pazienti consecutivi con amiloidosi AL, al momento della diagnosi, è stata misurata la concentrazione sierica delle FLC ed è stata eseguita su siero ed urine elettroforesi ad alta risoluzione su gel di agarosio con immunofissazione (HRAGE-IF).² Sette pazienti sono stati esclusi perché presentavano una gammopatia biclonale. La diagnosi di amiloidosi AL si basa sulla positività della biopsia al rosso Congo, e nei casi dubbi (12, 10%) la tipizzazione come AL si è avvalsa dell' immuno-elettron-microscopia. Le amiloidosi ereditarie sono state escluse per mezzo dell' analisi del DNA. La concentrazione delle FLC è stata misurata con *latex-enhanced immunoassay* (The Binding Site, Birmingham, UK) su nefelometro Behring BN II (Dade Behring, Deerfield, IL, USA). L'intervallo di riferimento per le catene leggere libere kappa e lambda è, rispettivamente, 3.3-19.4 mg/L e 5.7-26.3 mg/L, con rapporto kappa/lambda medio 0.59 (*range* diagnostico 0.26-1.65). La HRAGE-IF è stata eseguita su gel preparati presso il nostro laboratorio utilizzando anticorpi anti-IgG, IgA, IgM, kappa e lambda (Dako, Glostrup, DK).²

Risultati. Per mezzo di HRAGE-IF sono state individuate catene leggere monoclonali (31 kappa, 85 lambda) nel siero e/o nelle urine di tutti i 116 pazienti valutati. In 6 (5%) casi le catene leggere monoclonali erano rilevabili soltanto nel siero ed in 6 (5%) soltanto nelle urine. Il rapporto kappa/lambda era anormale in 90 pazienti (78%). In 10 pazienti (8%) con concentrazione di catene leggere libere kappa e lambda superiore al limite di riferimento, una delle due catene leggere era preponderante. In due casi, il clone individuato per mezzo della quantificazione delle FLC non concordava con la componente monoclonale rilevata alla HRAGE-IF. Questi dati confermano la necessità di utilizzare l'immunofissazione con buona risoluzione per la diagnosi di amiloidosi AL. La misura delle FLC è complementare ed utile nel *follow-up* della malattia.

1. Katzmann IA, et al. Clin Chem 2005; 51: 878-81.

2. Merlini G, et al. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 1025-8.

224

TOTAL AND ACTIVE MATRIX DEGRADING METALLOPROTEINASES IN AN EX-VIVO HUMAN MODEL OF RESTENOSIS

Colotti C., Vittorini S., Piersigilli A., Rossi G., Giannesi D.

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

Introduction: Neointima formation is a feature of restenosis after angioplasty and the adaptation of autologous human saphenous vein (SV) to implantation as coronary artery bypass grafts. Intimal thickening is due to the injury-induced transformation from a contractile to a synthetic phenotype of the media vascular smooth muscle cells (VSMCs) and their migration to the intima where they proliferate and secrete extracellular matrix proteins such as osteopontin, vitronectin and collagen VIII. Matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) are a family of extracellular proteinases thought to be essential for the remodeling of the basement membrane and of the interstitial collagenous matrix that enables VSMCs migration during neointimal formation. In this study, MMP-2 and MMP-9 expression and activity were examined as a function of the culturing time and intimal thickening, in a human SV model of hyperplasia.

Methods: SV segments, obtained with permission from 9 patients undergoing coronary artery bypass grafting, were collected and subsequently divided in four fragments: the sample 1 was embedded in paraffin for the morphometric assay; the sample 2 was stored at -80°C without any treatment; the samples 3 and 4 were cultured for 10 days, respectively in RPMI-1640 medium alone or added with 30% foetal calf serum (FCS), in a CO₂ incubator at 37 °C. After culturing, each SV segment was further divided in two pieces for the histological and biochemical analysis. Total MMP-2 and -9 levels in the culture media were measured by specific immunometric assays while MMP-2 and MMP-9 activities were determined by dedicated enzymatic assays. Histological analysis was performed by using the hematoxylin-eosin staining.

Results: Intimal hyperplasia as well as the production of MMP-2 and MMP-9 is induced in SV cultured in presence of FCS. Total levels of both MMPs increased as a function of the culture time (MMP-2: 33.2±5.9 ng/ml, mean±sem, at the first medium renewal and 67.4±11.2 at the end of FCS culture, p=0.024) and were higher in presence of FCS than in RPMI alone (at the end of the culture MMP-2: 67.4±11.2 vs 35.4±10.7 ng/ml, p=0.0396; MMP-9: 1.4±0.7 vs 0.84±0.52 ng/ml, respectively). In all cases, active MMP-2 and MMP-9 forms represent the 1-2% of the respective pro-MMPs.

Conclusion: The findings of the present study show an enhanced MMP-2 and MMP-9 production and secretion by SV, associated to intima hyperplasia progression, confirming the crucial role of these proteins in VSMC invasion and vessel remodelling.

Reference: Johnson J.L., van Eys G.J.J.M., Angelini G.D., George S.J. "Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix degrading metalloproteinases activity in human saphenous vein". Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21:1146-51.

225

VALUTAZIONE DEL CONTENUTO SPECIFICO DEL FERRO DELLA FERRITINA PLASMATICA IN PAZIENTI EMODIALIZZATI.

Rossi C¹, Spada PL², Bocca B³, Pastore P¹, Vulpio C², Cozza V², Palmieri G², Alimonti A³, De Sole P¹
Ist. Biochimica e Biochimica clinica¹ – Ist. Chirurgia generale² - Ist. Superiore della Sanità³ - Università Cattolica S. Cuore – Largo A. Gemelli 8, 00168 Roma

Scopo e obiettivo: Nei pazienti emodializzati il problema della terapia dell'anemia resta ancora attuale nonostante l'introduzione dell'eritropoietina ne abbia migliorato considerevolmente le condizioni cliniche (1). Accanto al deficit endogeno di EPO, il quadro anemico risulta solitamente aggravato da uno stato sideropenico; l'apporto esogeno di ferro risulta pertanto un elemento chiave nella risposta al trattamento con eritropoietina.

Nella pratica clinica si osservano di frequente situazioni nelle quali le indicazioni fornite dalla saturazione della transferrina e dalla ferritinemia risultano discrepanti anche in assenza di segni clinici e laboratoristici di infiammazione. Scopo del presente lavoro è di misurare il contenuto specifico di ferro della ferritina in pazienti dializzati al fine di avere migliori indicazioni sullo stato marziale dei pazienti in trattamento emodialitico cronico.

Materiale e metodo: 62 pazienti emodializzati cronici sono stati monitorizzati per circa due anni valutando trimestralmente il loro stato marziale mediante esame emocromocitometrico, sideremia, capacità ferro-legante e ferritinemia. Il contenuto specifico di ferro della ferritina è stato misurato previo assorbimento di una quantità di plasma contenente 2500 ng di ferritina con 0.5 ml di una sospensione di anticorpo anti-ferritina umana legata a particelle di lattice (Roche/Hitachi art. n. 1661400). Dopo opportuni lavaggi del complesso e sua idrolisi acida, il ferro della ferritina è stato misurato mediante spettrometria di emissione atomica utilizzando una spettrometro Optima 3100 XL della Perkin Elmer a 259.9 nm.

Risultati: I risultati ottenuti indicano: 1) una correlazione inversa ($P < 0.05$) tra il contenuto specifico di ferro della ferritina (atomi Fe/mole ferritina) e la ferritinemia; 2) una correlazione diretta ($P < 0.05$) tra il contenuto totale di ferro della ferritina, per unità di volume plasmatico, e la ferritinemia; 3) assenza di correlazione tra saturazione della transferrina e ferritinemia.

Conclusioni: I risultati ottenuti sembrano dare delle indicazioni utili ai fini di una migliore valutazione del fabbisogno di ferro dei pazienti emodializzati. Infatti, anche se il contenuto totale di ferro associato alla ferritina è pari a circa 1% del ferro legato alla transferrina, valori elevati di ferritinemia costituirebbero, nei pazienti emodializzati, un indice di sovraccarico marziale, tanto più marcato quanto maggiore è il suo contenuto specifico di ferro.

Bibliografia: 1) S. Fishbane et al. A randomized trial of iron deficiency testing strategies in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 60, 24006-11, 2001

226

INCIDENZA DELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI NEGLI ULTIMI CINQUE ANNI NEL TERRITORIO DI ORTONA (CH).

Di Pietro N., Ruffini I., Carosella R., Iubatti R., Tucci E.
Servizio Laboratorio Analisi, Ospedale "G. Bernabeo" Ortona, Primario Nubile G., ASL-Chieti.

Introduzione. Le Gammopatie Monoclonali (GM) rappresentano una condizione clinica caratterizzata dalla presenza nel siero e/o nelle urine di una componente monoclonale (CM). La CM è causata dall'espansione di un clone di cellule B che può essere maligna o benigna. La presenza di una banda omogenea, formata da immunoglobuline o loro frammenti sul tracciato elettroforetico, è un evento frequente in un Laboratorio di Patologia Clinica. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di osservare, da indagini routinarie, la percentuale di componenti monoclonali presenti e di classificarle nelle forme GM benigne, GM maligne e di MGUS.

Materiali e metodi. Nel nostro Laboratorio di Patologia Clinica abbiamo eseguito, negli ultimi cinque anni, 70.120 tracciati elettroforetici su una popolazione di circa 60.000 abitanti. L'elettroforesi proteica è stata eseguita su gel di agarosio con lo strumento HYDRASYS della ditta Sebia. Dall'osservazione visiva del tracciato elettroforetico sono state individuate le CM, per procedere alla tipizzazione ed alla ricerca della proteina di Bence Jones (BJ). La ricerca delle proteine di Bence Jones è stata effettuata su 1820 pazienti, mediante la tecnica dell'immunofissazione (della stessa Ditta) utilizzando le urine fresche del mattino.

Risultati. Su 70.120 tracciati elettroforetici sono stati individuati 1820 campioni con bande monoclonali pari al 2,59% e 68300 con assenza di componenti monoclonali. Dopo tipizzazione su siero dei campioni positivi, abbiamo riscontrato le seguenti componenti monoclonali con i relativi valori percentuali: 529 IgG K (29.07%), 687 IgG λ (37.75%), 84 IgA K (4.61%), 64 IgA λ (3.51%), 127 IgM K (6.98%), 43 IgM λ (2.36%), 246 CM doppie (13.52%), 20 CM triple (1.1%). 20 campioni hanno mostrato una componente monoclonale formata esclusivamente da catene leggere con una percentuale di 1.1%. Dalla ricerca della proteina di Bence Jones abbiamo riscontrato una positività di catene leggere (8,1%) suddivisa in una positività netta del 3.5% ed una positività molto debole del 4.6%.

Conclusioni. I dati ottenuti da noi sono risultati essere sovrapponibili a quelli della media nazionale. La individuazione di componenti monoclonali nei pazienti analizzati ha permesso al clinico di diagnosticare le diverse gammopatie. La netta positività della BJ induce ad una presunta malignità, mentre una debole positività è associata a forme benigne o di incerto significato (MGUS).

Bibliografia. Batuecas Mohedano M et al. Monoclonal gammopathy: a frequently overlooked diagnosis. *Rev Clin Esp.* 2005 May; 205(5):207-11.

227**HEAT SHOCK PROTEIN EXPRESSION DECREASES IN HUMAN SAPHENOUS VEIN INTIMAL HYPERPLASIA EX-VIVO.**

Giannessi D., Colotti C., Vitale R.L., Vittorini S., Piersigilli A, Del Ry S.
CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa and G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy.

Introduction: In restenosis after angioplasty both cell death and inhibition of cell proliferation may contribute to decrease the extent of hyperplasia. Heat shock proteins (HSPs), a family of proteins induced by injury, appear to play an important anti-apoptotic role in this condition, suggesting that preconditioning treatments, able to induce HSP expression in vascular smooth muscle cells, could modulate the apoptotic/necrotic processes and to have a role in the vascular remodeling associated to restenosis. In this study the levels of Hsp70, Hsc70, Hsp60 and Hsp27, the HSPs more relevant at the cardiovascular level, were measured in an ex vivo human model of intimal hyperplasia as a function of the culturing time and intimal thickening.

Methods: Saphenous vein (SV) segments, obtained with permission from 7 patients undergoing coronary artery bypass grafting, were collected and subsequently divided in four fragments: the sample 1 was embedded in paraffin for the morphometric assay; the sample 2 was stored at -80°C without any treatment; the samples 3 and 4 were cultured for 10 days, respectively in RPMI-1640 medium alone or added with 30% foetal calf serum (FCS), in a CO₂ incubator at 37 °C. After culturing, each SV segment was further divided in two pieces for the histological and biochemical analysis. Histological analysis was performed by using the hematoxylin-eosin staining while HSP determination was performed by using a quantitative western blotting analysis with specific antibodies directed to the protein of interest.

Results: After culturing SV in the presence of FCS we observed an increase of mean intimal thickening and a lumen reduction as resulted from the histological analysis. All HSP checked are expressed in SV, but Hsp60: Hsp27 was 2.5±0.15 and 1.3±0.21 µg/mg protein, mean±sem, p=0.006, and Hsc 70 was 3.1±1.3 vs 2.4±1.4, in basal conditions and at the end of FCS culture, respectively. Also Hsp72 levels are reduced after culturing in presence of FCS with respect to RPMI alone and to the basal conditions (1.02±0.92, 3.1±2.2 and 3.5±0.91 µg/mg protein, respectively).

Conclusion: After organ culture, a reduction of HSP levels in SV tissue is found, in agreement with previous results, possibly associated to apoptosis and vessel wall remodeling, as observed by the histological analysis.

Reference: Alcocer F. et al. Mutual exclusion of apoptosis and Hsp70 in human vein intimal hyperplasia in vitro. J Surg Res 2001; 96:75-80.

228**AD WITH SUB-CORTICAL WHITE MATTER LESIONS AND VASCULAR DEMENTIA: CSF MARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS**

Bernardini S.*, Infantino M.*, Ballerini S.*, Iori R.*, Bellincampi L.*, Valentini A.*, Rapanotti R.*, Nuccetelli M.*, Stefani A**, Bernardi G** and Federici G.*

*Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma.

** Clinica Neurologica, Dip. Neuroscienze, Policlinico Tor Vergata, Roma.

We investigated whether the cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers β -amyloid 1-42 (A β 1-42), total tau (t-tau) protein and tau protein phosphorylated at threonine 181 (p-tau 181) could discriminate Alzheimer's disease (AD) from vascular dementia (VD) patients. CSF samples of A β 1-42, t-tau and p-tau 181 were collected from probable AD (n=35), probable AD with white matters changes (WMC) indicative of concomitant cerebrovascular disorder (CVD, n=31), VD (n=20), and an age-matched subgroup of patients with other neurological disorders (OND) without cognitive impairment (n=24). AD patients showed very low A β 1-42 levels (median=393 pg/ml). A β 1-42, but not t-tau, differentiated AD from VD patients. However, the markers did not discriminate AD vs. AD plus WMC.

In particular, both subgroups showed similar CSF biomarkers but they were significantly different from VD. ROC analysis showed that A β 1-42 could discriminate AD from VD (AUC=0,85). The cut-off of 493 pg/ml. gave sensitivity and specificity values of 77% and 80%, respectively. Similar results were obtained when A β 1-42 was employed to discriminate AD with WMC from VD (95% specificity and 60% sensitivity, but with cut-off of 750 pg/ml). T-tau increased specifically in all cognitively impaired patients. P-tau 181 performed better than t-tau in discriminating AD (with or without WMC) vs. VD.

In conclusion, A β 1-42 proved to be a valuable tool to discriminate AD vs. VD patients and possibly to improve diagnostic accuracy in clinical forms, improperly classified as "mixed dementia" based on radiological vascular lesions.

1) Stefani A., Bernardini S. *et al.* Neur. of Aging 2004,25(S2)

229

OSTEOPONTIN IS PRODUCED BY CULTURED HUMAN SAPHENOUS VEINS AS A FUNCTION OF INTIMA HYPERPLASIA.

Colotti C., Maltinti M., Vittorini S., Piersigilli A., Vitale R.L., Del Ry S., Giannessi D.
CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa and G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy.

Introduction: Restenosis following PTCA and stenting remains the main limit to the long term efficacy of revascularization techniques. The typical vascular response consists of significant inflammation and neointimal proliferation with late lumen loss. Osteopontin (OPN) has been proposed to play a relevant role in the recruitment of leucocytes and macrophages to the damaged areas and in the mobilization and proliferation of vascular smooth muscle cells from the media to the vessel lumen along the stented area. Aim of this study is to evaluate the possible role of this effector in restenosis by using an ex-vivo model of human saphenous vein (SV) culture.

Methods: Paired SV segments, obtained from 10 patients undergoing coronary artery bypass grafting, were cultured for 10 days in RPMI-1640 medium alone or supplemented with 30% (v/v) fetal calf serum (FCS), respectively, in a CO₂ incubator. Intima thickness was determined before and at the end of both the organ cultures, by histological analysis by hematoxylin-eosin detection. OPN mRNA expression was determined by semiquantitative RT-PCR in vessel tissue. OPN and interleukin (IL)-6 concentrations were also measured in culture medium, collected at different times during culture, by specific immunometric assays.

Results: The intima thickness at the end of FCS culture was increased of about 40% with respect to culture with medium alone. OPN mRNA expression was detectable in SV tissue only after FCS culture, although the house-keeping GAPDH expression was similar before and after both cultures. The tissue content of IL-6 was significantly higher in FCS culture: 14.4±3.6 vs 2.2±0.73 ng/ml (p=0.026, mean±sem) for RPMI and it was undetectable before culture. Increasing levels of OPN were found in the FCS culture medium as a function of the culture time (at the end of treatment OPN: 4.88 ± 0.96 vs. 0.7 ± 0.36 microg/ml for control cultures, p<0.0003). Similarly, higher IL-6 concentrations were found in FCS medium (34.6±27.8 vs 6.4±5.3 ng/ml for cultures with and without FCS at the end of culture, respectively).

Conclusions: The increase of OPN in culture medium as a function of the time as well as the mRNA expression observed after culture confirm the capacity of vessels to produce and secrete OPN in the medium during culturing, positively related to the hyperplasia and to IL-6 production. These preliminary indications suggest a local vein production and secretion of OPN in the culture medium.

Reference: Welt F.G.P., Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1769-1776.

230

INDAGINE NAZIONALE SULL'IMPIEGO DELLA DETERMINAZIONE DELLA LIPASI

Zaninotto M.¹, Ceriotti F.², Panteghini M.³ per il Gruppo di Studio "Enzimi" SIBioC

¹ Servizio di Medicina di Laboratorio, A.O. Padova

² Laboratorio Standardizzazione, H. S. Raffaele, Milano

³ Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi di Milano

La determinazione della lipasi nel siero rappresenta l'indagine biochimica dotata di maggiore specificità per la diagnosi ed il monitoraggio della pancreatite acuta. Essendo questo enzima contenuto in elevate concentrazioni nelle cellule acinose del pancreas, la sua determinazione fornisce un'importante informazione sulla presenza di danno pancreatico, anche se alcune problematiche analitiche hanno in passato ostacolato la sua diffusione e standardizzazione. Negli anni recenti sono stati proposti metodi che hanno superato tali difficoltà, rendendo la determinazione della lipasi applicabile a strumentazione automatizzata ed eseguibile in regime di urgenza. Allo scopo di valutare lo stato dell'attuale diffusione dei metodi di misura della lipasi e delle scelte operative effettuate dai laboratori nazionali, nel 2004 il Gruppo di Studio "Enzimi" ha diffuso un questionario conoscitivo, al quale hanno risposto 83 laboratori. Di questi, 16 (19%) non eseguono l'indagine. Dei 67 (81%) che la eseguono, 85% utilizza metodi che impiegano il substrato sintetico 1,2-o-dilauril-rac-glicerolo-3-acido glutarico (6-metil resorufin)-estere; meno usati sono altri substrati, come la trioleina. Del substrato maggiormente diffuso sono presenti in commercio 11 differenti formulazioni analitiche con relative applicazioni strumentali. La conseguenza più significativa di queste differenti modalità operative è che, a parità di substrato e metodo utilizzati, i limiti superiori di riferimento dichiarati sono spesso significativamente differenti, con valori compresi tra 51 e 300 U/L. Relativamente ai motivi di esecuzione dell'indagine, il 66% dei laboratori la esegue sia nella diagnostica d'urgenza della pancreatite acuta che nel suo monitoraggio, mentre il 34% misura la lipasi solo nel monitoraggio. La determinazione della lipasi viene effettuata in associazione a quella dell'amilasi totale dal 42% dei laboratori, il 15% la esegue in associazione con la sola amilasi pancreatica ed il 22% con entrambi. La numerosità mensile delle richieste è per il 54% dei laboratori <50, per il 27% compresa tra 50 e 200 e per il 25% >200. Infine, la partecipazione ad una Verifica Esterna di Qualità per questo parametro rappresenta una pratica consolidata solo per circa i 3/4 (76%) dei laboratori che lo determinano. I dati ottenuti evidenziano come ancora esista una scarsa attenzione da parte dei laboratori italiani nell'implementazione di un esame caratterizzato da elevata accuratezza diagnostica. Inoltre, pur utilizzando spesso il medesimo metodo, i laboratori che eseguono la determinazione possono fornire risultati tra loro anche molto differenti, con possibile impatto negativo sulla sua efficienza clinica.

231**MODIFICAZIONI ELETTROFORETICHE E DELLE IMMUNOGLOBULINE DEL SIERO INDOTTE DA PENICILLAMINA.**

Luraschi P.¹, Infusino I.¹, Pirovano L.², Panteghini M.^{1,3}, Franzini C.³

¹Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, A. O. L.Sacco, Milano; ²Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale San Gerardo, Monza. ³Università degli Studi, Milano.

La elettroforesi capillare (CZE) delle siero-proteine è adeguata per evidenziare e misurare le componenti monoclonali (CM). Alcune CM di tipo M sono rese evidenti dal pretrattamento con penicillamina (PEN). Si è verificato l'effetto del pretrattamento con PEN sul quadro CZE e sulla concentrazione di immunoglobuline (Ig) immunonefelometriche, in 204 sieri, comprendenti normali, iper- γ -globulinemie policlonali e gammopatie mono-clonali di cui 101 di tipo IgM, classificati sulla base di quadro CZE, immunosottrazione e immunofissazione su gel di agarosio. Di ciascun siero, una aliquota era trattata con PEN (PEN+) e una non era trattata (PEN-): di tutte si eseguiva analisi con CZE (CZE Paragon 2000, Beckman) e misura immuno-metrica (Image, Beckman) di IgA, IgG ed IgM. Le variazioni [(PEN+)-(PEN-)] (delta) erano analizzate statisticamente e visualizzate come grafici di dispersione y/x. Espresi in % del valore PEN- i valori medi di delta risultavano: per IgA ridotti e non significativi (da -2,9 a +1,2 %); per IgG più elevati, negativi e significativi (da -7,4 a -5,3 %, $p < 0,004$); per IgM ancora più elevati, positivi e significativi (da +4,7 e + 23,9 %, $p < 0,006$). Il quadro CZE mostrava significative diminuzioni delle γ -globuline (da -0,7% a -2,48%, $p < 0,001$) ed aumenti delle β -globuline (da +0,8 a +3,2%, $p < 0,001$). In CM-IgM "piccole" (n = 9) la CM era evidente in CZE solo dopo pretrattamento con PEN. In CM-IgM "grandi" (n = 28) il trattamento con PEN spostava il picco della CM dalla zona γ verso la zona β . Si conclude che il pretrattamento con PEN rende evidenti un maggior numero di CM-IgM. Inoltre, modifica i valori delle frazioni CZE β e γ e delle IgG e IgM immunonefelometriche.

232**L'ELETTROFORESI CAPILLARE E' PIU' SENSIBILE DELL'IMMUNOFISSAZIONE NEL RILEVARE COMPONENTI MONOCLONALI IgG.**

Pateri F.¹, Dolci A.²

¹Laboratorio Centrale H.S. Paolo, Università di Milano, ²Dipartimento di Patologia MultiMedica, via Fantoli 16/15, 20138 Milano

Razionale: nella rilevazione delle componenti monoclonali (CM), l'immunofissazione mostra una sensibilità analitica 5-10 volte superiore all'elettroforesi (EF) eseguita con la stessa tecnica (1), ma attualmente in molti laboratori si utilizza l'elettroforesi capillare (CZE) per lo screening e l'immunofissazione su gel di agarosio (IFE) per la caratterizzazione delle CM.

Scopo del lavoro: definire il rapporto tra la sensibilità analitica della CZE e della IFE nella rilevazione delle CM del siero.

Metodologia: sono state selezionate alla CZE di routine (Capillarys, Sebia) 4 CM, una per ogni classe immunoglobulinica più una di catene leggere libere, 3 migranti in zona γ ed 1 in zona β_2 , quantificate sull'analizzatore mediante lettura spettrofotometrica ed estrapolazione grafica, e tipizzate in IFE (Hydrasys Sebia) come IgG λ , IgA κ , IgM κ e catene λ libere. Le 4 CM, la cui concentrazione iniziale era rispettivamente di 18.1, ancora 18.1, 9.1 e 1.8 g/L, sono state diluite con sieri non patologici (non CM rilevabili all'IFE, proteine totali: 68-72 g/L) fino alla concentrazione di 1 g/L, e quindi con diluizioni scalari, ed analizzate in CZE ed in IFE per definire la sensibilità dei due metodi.

Risultati: sono riassunti in tabella, dove il rapporto tra le due sensibilità permette immediatamente di cogliere se la IFE è più sensibile della CZE (rapporto >1) o viceversa (rapporto <1).

CM	Sensibilità CZE (g/L)	Sensibilità IFE (g/L)	Sensibilità CZE/IFE
IgM κ in zona γ	0.10	0.04	2.50
IgA κ in zona β_2	1.00	0.2	5.00
IgG λ in zona γ	0.06	0.20	0.33
catene leggere libere λ in zona γ	0.30	<0.05	almeno 6

Conclusioni: molte variabili possono influire sulla sensibilità analitica della CZE e dell'IFE nella rilevazione delle CM: il suo punto di migrazione, specie in CZE, dove la zona β_2 mostra uno scarso potere risolutivo, il tipo, l'intensità del background di Ig policlonali ed infine, limitatamente alla IFE per la CM di catene leggere libere, il tipo di anticorpo utilizzato (anti-catene leggere totali o libere). Ma il dato più significativo dello studio è, secondo noi, che la CZE risulta circa 3 volte più sensibile della IFE nella rilevazione della CM IgG. Questo ribalta le attuali prospettive di sensibilità e richiede una revisione delle logiche operative di ricerca e conferma delle CM.

Bibliografia: (1) Bossuyt X et al. Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/subtraction. Clin Chem. 1998 Apr;44(4):760-4.

233

SCREENING DI CM IN UN CAMPIONE RAPPRESENTATIVO DELLA POPOLAZIONE SICILIANA NEL DISTRETTO NEBROIDEO

#Di Pietro R., #Portera M., #Antoci F. #Di Marco B., #Messina S., *Falliti G., *Bellomare G.
#Laboratorio Analisi – P.O. “S.S. Salvatore”, Mistretta
*Laboratorio Analisi – Istituto Mediterraneo Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), Palermo

Introduzione. Il riscontro occasionale nei tracciati elettroforetici di Componente Monoclonale (CM), soprattutto in pazienti asintomatici, induce ad approfondire gli accertamenti diagnostici mediante appositi algoritmi per la correlazione con patologie neoplastiche, infettive, autoimmuni e nel post-trapianto; a pianificare il monitoraggio di CM in pazienti con CM di significato incerto; a stabilire eventuali familiarità in ambito locale. Solo il criterio di progressività della stessa CM e sulla base dell'insorgenza di sintomi può definire la natura benigna o maligna di una CM.

Metodi. Sono stati eseguiti, presso l'Ospedale di Mistretta, nel quinquennio 1999-2004, 16500 tracciati di elettroforesi delle sieroproteine su gel di agarosio (Sebia Hydrasis LC) e, dopo aver scartato le ripetizioni ed i tracciati di soggetti non residenti, sono risultati 8851 tracciati di soggetti residenti nel Distretto. Per tutti i campioni nei quali si è evidenziata una CM si è proceduto alla tipizzazione di tale componente con la tecnica dell'Immunofissazione su gel di agarosio (Sebia Hydragel 2 IF).

Risultati. Nel corso dei 5 anni di studio sono state evidenziate al profilo proteico una o più CM in 113 campioni di siero (prevalenza dell'1.2%). L'età media dei casi con CM è risultata essere di 65 a., con il 57% costituito da donne ed il 43% da uomini. E' stata evidenziata una prevalenza delle catene leggere di tipo IgG K (42%). I casi diclonali sono stati solo 2 e le doppie CM 1. Solo in 2 casi sono state evidenziate delle false CM dovute alla presenza di crioprecipitato.

Conclusioni. La situazione orogeografica e demografica del territorio nebroideo ci hanno consentito di analizzare un campione rappresentativo della popolazione siciliana con risultati che evidenziano minimi scostamenti da altri dati rilevati in Sicilia e sul territorio nazionale. Risultano prevalenti le CM di tipo K (60%) con una frequenza maggiore di riscontro in donne. La sistematicità nel rilevare e monitorare le CM rappresenta un valido ausilio in una politica di attenzione ai problemi territoriali con l'instaurarsi di un rapporto diretto tra Laboratorio ospedaliero e Medici territoriali. L'algoritmo diagnostico dovrà consentire il follow up dei pazienti con CM per diagnosticare precocemente l'eventuale insorgenza di patologie emolinfoproliferative.

Bibliografia. 1) Falliti G., et al., Il Patologo Clinico 5-6,281,2002

234

MARCATORI TUMORALI E PROTEOMICA; UN NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO ALL'EPATOCARCINOMA.

Bottoni P., Pastore P., Giardina B., Martorana G.E., Zuppi C., Scatena R.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica. Università Cattolica. Largo A. Gemelli 8, 00168 Roma.

Scopi e obiettivi. Il carcinoma epatocellulare (CE) rappresenta più del 5% di tutti i tumori maligni, ed è la principale causa di morte nei pazienti con cirrosi compensata. L'incidenza del tumore è in crescita e la prognosi è particolarmente severa considerando che tale neoplasia conduce all'exitus in genere entro 6 mesi dalla diagnosi. Questo soprattutto per la mancanza di validi markers di diagnosi precoce (1).

Lo scopo di questo studio è di evidenziare significative differenze nei profili proteici legati allo stato differenziato/sdifferenziato dell'epatocita al fine di identificare potenziali nuovi markers diagnostici e/o prognostici.

Materiali e metodi. Utilizzando vari agenti differenzianti, lo stato di differenziamento di una linea cellulare di epatocarcinoma umano (Hep-G2) è stato modulato e quindi studiato attraverso tecniche enzimatiche, immunoenzimatiche e proteomiche.

Risultati. I risultati dimostrano che gli agenti differenzianti utilizzati riducono significativamente la cinetica di proliferazione dell'epatocarcinoma e modificano il fenotipo delle cellule neoplastiche, inducendo l'espressione di proteine tipiche dello stato differenziato. Inoltre tali modifiche fenotipiche e funzionali risultano associate all'espressione di proteine che potrebbero risultare potenziali marker diagnostici e prognostici del CE quali la catalasi e la HSP70.

Conclusioni. La possibilità di monitorare il livello di differenziamento di una cellula tumorale potrebbe permettere una migliore definizione delle modificazioni e delle interrelazioni che intercorrono tra "proteoma", "genoma" e "metaboloma" facilitando in tal modo l'identificazione di accurati e sensibili biomarkers diagnostici e prognostici del cancro in genere e dell'epatocarcinoma in particolare.

1. Marrero JA. Hepatocellular carcinoma. Curr Opin Gastroenterol. 21:308-12, 2005.

235**ELABORAZIONE DI UN MODELLO
DIAGNOSTICO IN PAZIENTI RCC UTILIZZANDO
MALDI-TOF/TOF ACCOPPIATO A CLINPROT**

Sanvito R.¹; Magni F.¹; Kostrzewa M.⁵; Elssner T.⁵; Deininger S.⁵; Sarto C.¹⁻²; Ferrero Bogetto S.⁴; Bosso N.¹; Favoni P.³; Tripepi G.⁶; Rocco F.³; Mocarelli P.¹⁻² e Galli Kienle M.¹.

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale Ambientale e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi Milano-Bicocca, Via Cadore 48, 20052 Monza (MI)

²Dipartimento del Laboratorio di Medicina, Ospedale di Desio, Via Mazzini 1, 20033 Desio (MI)

³Istituto of Urologia, Ospedale Maggiore di Milano IRCCS, Università di Milano, Via F. Sforza 28, 20133 Milano

⁴Dipartimento di Medicina Chirurgica e Anatomia Patologica, Ospedale S. Paolo, Università di Milano, Via di Rudini 8, 20133 Milano

⁵Bruker Daltonik GmbH, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germania

⁶Bruker Daltonics S.r.l., Via Pascoli 70/3, 20133 Milano

Nell'ambito diagnostico la tecnica ClinProt applicata alla spettrometria di massa apre una nuova strada verso l'individuazione di marcatori proteici in campioni di fluidi biologici provenienti da soggetti sani e pazienti¹. Dopo un selettivo arricchimento peptidico e proteico mediante l'uso di biglie magnetiche attivate con superfici specifiche, i campioni vengono analizzati tramite MALDI-TOF e gli spettri risultanti sottoposti ad indagine tramite un avanzato software basato sull'utilizzo di un algoritmo genetico.

Lo scopo di questo studio è stato valutare l'abilità di tale metodica nell'evidenziare differenze del pattern proteico in campioni provenienti da urine di 17 pazienti RCC e di 34 controlli sani dopo separazione e arricchimento con biglie C8. I profili spettrali hanno rivelato significative differenze delle intensità di vari ioni tra i due gruppi di campioni e la loro elaborazione ha permesso di sviluppare un modello in grado di discriminare tra le due popolazioni. Tra gli ioni analizzati è stato identificato, tramite MS tandem, il frammento peptidico Ser₅₆₅-Arg₅₈₂ dell'uromodulina, che è stato proposto come possibile biomarcatore per la diagnosi dell'RCC.

Bibliografia:

1. Zhang X, Leung SM, Morris CR, Shigenaga MK. J Biomol Tech. 2004 Sep;15(3):167-75.

236**ANALYSIS OF CARNITINES IN HUMAN PLASMA
BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS ESI-IT
MASS SPECTROMETRY DETECTION**

Desiderio C.¹, Mancinelli A.², De Rossi A.¹, Inzitari R.³, Calvani M.², Castagnola M.³ e Zuppi C.³

¹Istituto di Metodologie Chimiche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Monterotondo, Roma, Italy

²Dipartimento Scientifico SIGMA-TAU, Pomezia Roma

³Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy.

Introduction: Carnitine is a family of endogenous compound with pivotal role in energy metabolism. In body fluids carnitines are present in free and esterified forms (acylcarnitines). Plasma levels of these compounds are strongly affected by genetic metabolic disorders and/or several diseases. The availability of sensitive and high resolution analytical methodologies able to determine and free carnitine and its short chain metabolites in plasma matrix are of relevant importance for both diagnostic purposes. Up to date, total and free carnitines are measured by several methods: radioenzymatic, HPLC, CE. Recently mass spectrometry approaches using FAB-MS-MS and ESI-MS-MS were introduced.

We proposed to apply CE ESI-IT mass spectrometry methodology for a rapid screening of short chain carnitines in human plasma.

Experimental: Separations were performed in a CE automated apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled with electrospray ionization interface to an ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operating in positive polarity and MS/MS MRM mode. CE separation were performed in uncoated silica fused capillary of 50 µm i.d. and 70 cm length using ammonium formate buffer pH 2.5 as background electrolyte. Plasmas were injected after a simple deproteinization procedure with acetonitrile.

Results: The CE-ESI-MS method was optimized for: buffer composition, pH and concentration, sheath liquid composition. The suggested experimental conditions separate in less than 9 min carnitine, acetylcarnitine and propionylcarnitine in both full scan and MS/MS detection mode. The method was validated by standards at ranges between 5-160, 1-32 and 0.25-8.00 µM for carnitine, acetylcarnitine and propionylcarnitine, respectively.

The high efficiency and resolution that characterises the CE technology allows to minimise the sample pretreatment contributing to the development of rapid and simple analysis methodologies. Due to the high detection sensitivity, the proposed method, provides the detection of nanomolar carnitine concentrations.

Further advantages of this method include good precision, accuracy and linearity.

237

BIOCHEMICAL MARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA SYNDROME

Callà C., Mormile F*, Colacicco L., Lipa S., Giardina B., Gozzo M.L.
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica e Istituto di Fisiopatologia Respiratoria*, Università Cattolica del S. Cuore Roma.

Obstructive sleep apnea syndrome (OSA) is characterized by recurrent episodic hypoxia during sleep and is associated with cardiac and cerebral complications leading to an increased mortality. A pathogenetic hypothesis is that recurrent apneas and hypoxia result in a direct vascular damage mediated by ROS production.

The aim of the study is to verify if the circulating levels of some biochemical markers may reflect the status of systemic oxidative stress and if they are correlated with nocturnal respiratory events.

Methods: 35 patients referred to the Sleep Unit for OSA of the Clinical Respiratory Physiopathology Department and 66 control subjects were included into the study. Informed consent of all subjects was obtained. We monitored the nocturnal respiratory functionality with a V-max spirometer (SAO₂) (Senseo Medics, California). The plasma concentration of free oxygen radicals and their metabolites (ROMs) was determined by using the d-ROMs test kit (Diacron Italia s.r.l.). The plasma concentrations of coenzyme Q10 was determined according to Lipa et al. The total serum concentration of thiol groups (SH) was determined according to Ellman et al. by using the reagent kit from Diacron s.r.l. **Results:** in OSA patients with respect to the controls the plasma concentration of the ROMs was increased whereas those of SH and CoQ10 are decreased.

SAO₂ was inversely proportional to ROMs levels and directly to SH concentration.

The most impressive result of our study is that OSA patients show a significant reduction of circulating levels of the two oxidant scavengers SH and ubiquinone. This was paralleled by a significant increase of the ROMs concentration.

Conclusion: these data are consistent with a systemic oxidative stress resulting from ROS production due to hypoxia occurring during recurrent apneas.

References

1. Zulueta et al. Free Radical Biol Med 1999 15, 28
2. G. Ellman Arch. Biochem Biophys. 82,70, 1959
3. Lipa et al. Atti della I° Conferenza Nazionale su "La cromatografia liquida ad alta risoluzione in analitica clinica: situazione attuale e prospettive". Verona 1985 pag.51.

238

LOW SERUM FETUIN-A LEVELS IN RENAL FAILURE PATIENTS ON HEMODIALYSIS

Vocca L., Bellia C., Provenzano R.*, Li Vecchi M.* and Ciaccio M.

Chair of Clinical Biochemistry and *Chair of Nephrology, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction: Fetuin-A, also known as α_2 -Heremans-Schmid glycoprotein (AHSG), is a 59 kDa glycoprotein that consists of two amino-terminal cystatin domains and a smaller carboxyl-terminal domain. Fetuin-A is synthesized by the liver and secreted into the blood stream; it occurs in high serum concentration during fetal life and involves in protease inhibitory activities and development-associated regulation of calcium metabolism and osteogenesis. Many biological studies have demonstrated that fetuin-A may act as a systemic inhibitor of ectopic calcification by interfering with calcium salt precipitation in vessels. Recently have been shown that uremic patients on hemodialysis have lower serum fetuin-A levels in comparison with healthy controls. In addition, low fetuin-A level may be associated with a higher cardiovascular risk in patients on dialysis.

Aim: Our purpose was to confirm the fetuin-A deficiency in a group of our patients on hemodialysis and therefore the association between low fetuin-A levels and dialysis.

Methods: We established serum fetuin-A concentrations by a sandwich immunoenzymatic assay (ELISA) using two selected goat anti-human fetuin-A polyclonal antibodies that bind to different epitopes of human fetuin-A, secondary horseradish peroxidase conjugated antibody and the chromogenic substrate tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. Briefly, we prediluted serum 10000-fold and coated it onto microtitre plate. After incubation with the above antibodies and substrate, we measured extinction in a plate reader at 450 nm and compared this result with an appropriate standard curve of human fetuin-A.

Results: The serum fetuin-A concentration in adult mammals ranges from 0.5 – 1.5 g/L. All the 48 patients of our cohort have shown serum fetuin-A levels lower than the slightest range value (≤ 0.5 g/L) with a mean value of 0,3 g/L (SD = $\pm 0,242$).

Conclusions: Others have already determined that in dialyzed patients serum fetuin-A concentrations are significantly lower than those in healthy controls and correlate inversely with all-cause and cardiovascular mortality; according to these findings, our patients show low serum fetuin-A levels. In conclusion, our results confirm fetuin-A deficiency as a novel uraemia-related mortality risk factor in patients on hemodialysis; thus, measurement of circulating fetuin-A may add valuable prognostic information.

Reference: Ketteler M. et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003. 361;827-833.

239

IMPLEMENTAZIONE IN UNA SEZIONE DI URGENZA DELL' ELETTROFORESI CAPILLARE: CONFRONTO CON GEL D'AGAROSIO.

Rosa A.M., Falcone M., Ianzano A., Di Pumpo S., De Carolis M.G., Tappi S., Celozzi A.M., Simone F., Antonetti R.
Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio Foggia

L'elettroforesi proteica è un esame importante nella diagnosi clinica. Nel luglio 2004 è stata introdotta nel 2° Laboratorio Analisi dell'Azienda OO.RR.-Università di Foggia l'elettroforesi capillare (CE), metodica che prevede tempi ridotti, un caricamento continuo dei campioni e la possibilità di rilevare picchi monoclonali anche di modeste concentrazioni.

Scopo dello studio : valutare la validità del nuovo strumento per precisione, accuratezza e sensibilità e confrontare i tracciati elettroforetici ottenuti con il CAPILLARYS della Sebia con quelli eseguiti con il Gel d'agarosio (AGE) dell'Helena Laboratories.

Metodi/Risultati . Sono stati analizzati 100 campioni di siero provenienti dai reparti ospedalieri, universitari e da pazienti ambulatoriali. Altri 12 campioni con CM piccola, media e grande sono stati esaminati in doppio e sono state evidenziate le CM per il calcolo percentuale ed in g/l. Le CE sono state eseguite con il kit CAPILLARYS β 1- β 2, mentre le AGE sono state eseguite con il kit REP PROTEINS B1-B2.

Nell'e. capillare, in completa automazione i campioni da esaminare sono iniettati all'estremità anodica di 8 capillari rivestiti di silice fusa. La separazione delle proteine si ottiene applicando una tensione elettrica di 7.7 Kv per 4 min. in buffer a pH 10 a 35°C. La rilevazione delle frazioni proteiche avviene nella zona catodica per fotometria di assorbimento a 200 nm.

La validità dell'el. capillare è stata ottima per riproducibilità dei dati ottenuti dall'analisi inter-serie e intra-serie di 20 replicati di due pool di sieri normali e patologici (DS < 1.8 e CV < 6.9%) e per la sensibilità ottenuta dopo aver diluito scalarmente un siero con CM di 0,74 g/dl. Dal confronto tra le due metodiche sono stati rilevati i seguenti coefficienti di correlazione:

alb 0.947; alfa1 0.765; alfa2 0.909; beta1 0.782; beta2 0.708; gamma 0.958.

Conclusioni: tra i due metodi vi è una buona concordanza soprattutto nei 12 sieri con CM (0.977). I coeff. di corr. < 0.9 sono dovuti alla differente quantificazione delle proteine: il gel si basa sulla affinità colorante-proteina, la capillare sulla misurazione dell'assorbimento di tutti i legami peptidici: alfa1 più alte con la CE che con l'AGE derivano dal fatto che l'alto contenuto di acido sialico presente nell'alfa1-glicoproteina acida interferisce con la colorazione proteica e rende la misura meno accurata. Quindi la CE è una metodica ottima non solo nelle sezioni d'urgenza (TAT di circa 10'), ma anche nei laboratori di routine per la sensibilità più elevata dell'agarosio, per l'accuratezza e soprattutto per la completa automazione.

240

CONTENUTO PLASMATICO DEI GRUPPI TIOLICI E DEI METABOLITI REATTIVI DELL'OSSIGENO.

Minucci A.*, Persichilli S.*, Rossi C.*, Spada PL[§], Diaco ML[°], Roccarina D[°], Paladini S.[°], De Sole P*.

* istituto di biochimica e biochimica clinica, [§]servizio di emodialisi, [°]istituto di medicina interna università cattolica del sacro cuore - roma

Scopo Il gruppo tiolico (-SH), presente nel sito attivo di molte proteine esplica la sua funzione nella regolazione enzimatica e nella modulazione dei recettori cellulari di segnale. I tioli plasmatici intervengono nella protezione contro lo stress ossidativo. Variazioni nello stato redox extracellulare hanno un impatto significativo sulle funzioni cellulari come la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi; numerose evidenze indicano che alterazioni biochimiche e cellulari dovute allo stress ossidativo sono alla base di diverse condizioni morbose. Scopo di questo lavoro è la valutazione dei gruppi -SH e dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs) in pazienti ospedalizzati aventi patologie non chirurgiche.

Metodi. I ROMs e i gruppi SH sono stati determinati tramite metodi spettrofotometrici applicati a strumenti automatici (OLYMPUS AU 400).

I ROMs e i gruppi SH sono stati eseguiti su 260 pazienti ricoverati nei reparti di angiologia, cardiologia, emodialisi, diabetologia, e oncologia del Policlinico Universitario "Agostino Gemelli" e in gruppo di 70 donatori di sangue del centro trasfusionale dello stesso Policlinico.

Risultati. Nel gruppo di controllo i livelli dei ROMs e dei gruppi -SH sono rispettivamente 271.9 ± 6.2 U.Carr. e 579.5 ± 6.4 μ mol/L; nei soggetti ricoverati, globalmente considerati, i ROMs e i gruppi -SH sono rispettivamente pari a 344.2 ± 5.9 U.Carr. e 434.1 ± 6.4 μ mol/L.

L'analisi tra gruppi mostra una elevata significatività statistica della differenza tra gruppi sia per i ROMs (p < 0.001) che per gli SH (p < 0.001). Considerando gli SH e i ROMs separatamente e le coppie di valori SH/ROMs si osserva che la potenza discriminante (percentuale di pazienti che presentano valori > o < a 2ds dei valori dei controlli) di questi ultimi non differisce da quella degli SH da soli.

Conclusioni. Un aumento nella produzione di Specie reattive dell'Ossigeno (ROS) e delle funzioni antiossidanti di detossificazione contribuiscono ad uno squilibrio tra le reazioni di riduzione e di ossidazione, che si riflette nell'equilibrio extracellulare tra i tioli e disolfuri. I risultati ottenuti indicano chiaramente che i ROMs, gli SH e le coppie di SH/ROMs forniscono fondamentalmente la stessa informazione. Tuttavia i valori di SH e delle coppie SH/ROMs presentano lo stesso potere discriminante che però risulta maggiore di quello dei ROMs. La determinazione dei gruppi SH plasmatici, quindi, fornisce un parametro adeguato da utilizzare come indice aspecifico di stress ossidativi

Siobhan E. et al. Annu.Rev.Nutr.2004. 24:481-509.

241

ANALISI DI CISTEINA CISTEINILGLICINA E GLUTATIONE NEL LIQUOR: CORRELAZIONE CON IL DANNO DI BARRIERA

Minucci A., Persichilli S., De Michele T., Scribano D., Mascagna G., De Sole P., Giardina B., Zappacosta B.*
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

* Centro di Ricerche e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Scopo: Il liquido cefalorachidiano (denominato anche liquor) è un fluido che permea il sistema nervoso centrale e lo mantiene in sospensione, proteggendolo e contribuendo alla regolazione della pressione intracranica.

L'analisi del liquido cefalorachidiano, attraverso la misura di glucosio, proteine totali, indice di link (rapporto tra Albumina liquor/siero) insieme all'analisi delle bande oligoclonali, rappresenta un importante strumento diagnostico nelle patologie infiammatorie a carico del sistema nervoso centrale. Diversi studi hanno inoltre messo in evidenza l'importanza di un adeguato sistema di difesa antiossidante nei confronti dell'aumentato stress ossidativo che si verifica in diverse patologie neurodegenerative.

Scopo di questo lavoro è la valutazione dei livelli di cisteina (Cys), cisteinilglicina (CysGly) e glutatione (GSH) nel liquor in relazione alla presenza di danno di barriera e di bande oligoclonali.

Metodi: glucosio, proteine totali, l'indice di Link insieme all'analisi delle bande oligoclonali sono stati determinati su 30 campioni di liquor.

Cys, CysGly e GSH sono stati determinati mediante HPLC secondo il metodo di Araki e Sako. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un test non parametrico dividendo la popolazione in base alla presenza o meno di bande oligoclonali e di danno di barriera. Nessun paziente presentava contemporaneamente presenza di danno di barriera e di bande oligoclonali.

Risultati: La Cys mostra una significativa correlazione diretta con il danno di barriera, espresso come indice di Link ($R^2=0.77$), mentre la correlazione risulta meno significativa ($R^2=0.64$) per la CysGly e del tutto assente per il GSH. I soggetti con presenza di bande oligoclonali presentano livelli di glutatione significativamente più bassi rispetto ai controlli ($0.28 \mu\text{mol/L}$ vs. $0.62 \mu\text{mol/L}$, $p=0.03$). Nessuna differenza è stata osservata per i valori di Cys e CysGly.

Conclusioni. I risultati ottenuti indicano che i soggetti con presenza di bande oligoclonali, a causa dello stato infiammatorio e del danno neurodegenerativo, presentano livelli più bassi di GSH presumibilmente a seguito di un accentuato consumo nei processi di detossificazione. La forte correlazione della Cys, e in misura minore della CysGly, è invece imputabile al passaggio di albumina dal sangue attraverso la barriera ematoencefalica con conseguente trasporto di Cys.

242

STUDIO DI UN CASO DI BISALBUMINEMIA TRANSITORIA IN CORSO DI ASSUNZIONE DI SALI DI ORO PER IL TRATTAMENTO DI ARTRITE REUMATOIDE.

Sarnelli B., Abate R., Matrone G., Mercogliano A., Morelli M.L., Nuzzolo R., Ingala F.

Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia – P.O. "Ascalesi" Via E. a Forcella 31- 80139 Napoli

Premessa. L'eterogeneità riscontrabile nelle proprietà di carica dell'albumina serica può essere dovuta sia alla presenza di varianti genetiche della struttura primaria della proteina (es. nel numero dei gruppi -SH liberi), la cui espressione fenotipica è legata alla familiarità; sia ad un fenomeno *transitorio* conseguente al legame con diverse sostanze in grado di indurre modifiche del punto isoelettrico (es. antibiotici betalattamici), o ancora a lieve proteolisi da parte degli enzimi pancreatici (es. in corso di pancreatiti). L'osservazione di due bande di albumina nettamente distinte nel tracciato elettroforetico delle sieroproteine, o "*Bisalbuminemia*", è un evento infrequente (prevalenza pari a 0,035%), permanente o transitorio, non accompagnato da sintomatologia specifica.

Caso clinico. Un paziente di 67 anni affetto da cardiopatia ischemica trattata farmacologicamente con beta-bloccanti e nitroderivati, già più volte sottoposto ad esami ematochimici nel corso di precedenti ricoveri, non aveva mai presentato significative alterazioni del tracciato elettroforetico delle sieroproteine. Lo stesso soggetto, tornato alla nostra osservazione, riferiva di essere stato sottoposto, nelle precedenti cinque settimane, a terapia con Sali di oro per il trattamento dell'artrite reumatoide manifestatasi negli ultimi mesi. Per la prima volta, in quest'ultima osservazione, il tracciato elettroforetico in gel di agarosio presentava una banda in posizione anodica, pari a 1,56 g/dl, nettamente distinta rispetto a quella dell'albumina. La stessa frazione veniva rilevata nell'elettroforesi delle proteine urinarie (Fig.1). La variante proteica, caratterizzata mediante immunoelettroforesi, presentava sostanziale identità immunologica con l'albumina. Tornato ad ulteriore controllo dopo circa quindici settimane, il paziente, che aveva sospeso la terapia con Sali d'oro, non mostrava più apprezzabili elementi di eterogeneità nella frazione delle albumine (sia seriche che urinarie) separata mediante una corsa elettroforetica in gel di agarosio a pH 9.5, in un potenziale di 220 mV, per un tempo di 35' (sistema *Hydrasys* SEBIA®).

Discussione. L'insorgere di modifiche della mobilità elettroforetica dell'albumina indotta da farmaci è un fenomeno ben documentato. Esistono altresì riferimenti riguardanti casi di *bisalbuminemia* transitoria in pazienti affetti da artrite reumatoide; in questi ultimi *report*, tuttavia, vista la concomitante assunzione di altre molecole potenzialmente in grado di indurre *bisalbuminemia*, non è chiaro il ruolo della terapia con Sali di oro. Il caso da noi riportato si presenta con caratteristiche più favorevoli alla formulazione di una ipotesi di rapporto di causa-

242

effetto tra la terapia e l'anomalia. Difatti, sia la comparsa del fenomeno, sia la sua reversibilità nel *follow-up*, sono paralleli nel tempo all'andamento della terapia con Sali di oro ed indipendenti dai atri trattamenti concomitanti.

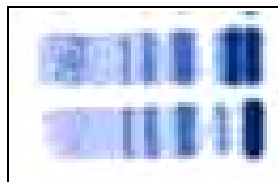


Figura 1

243

UN MODELLO INNOVATIVO DI VEQ: I CASI CLINICI

Incorvaia L.R.¹, Pezzilli R.², Campieri C.³

1-Gruppo VEQ - A.O.U. di BO Pol. S.Orsola-Malpighi

2-Dip. Medicina Interna, A.O.U di Bologna

3-Dip Nefrologia e Urologia, A.O.U di Bologna

Nel 2004 per il profilo Chimica Clinica sono stati inviati 2 campioni di controllo denominati "casi clinici" per sperimentare un modello innovativo di VEQ che porta un valore aggiunto a quanto già si fa nei programmi di controllo classici. Lo scopo era quello di stimolare la professionalità dei laboratoristi nell'interpretare la congruenza tra dati analitici e clinici. Sono stati preparati e inviati campioni con valori caratteristici di un quadro clinico ben definito unitamente all'anamnesi clinica del paziente. La valutazione dei risultati è stata effettuata da uno staff medico specialistico per la parte clinica in collaborazione con il referente VEQ del profilo per la parte analitica.

1° caso clinico: funzionalità epatica.

Donna di 35 anni con un recente episodio di dolore addominale

Parametri biochimici richiesti

Bilirubina frazionata, Gamma GT, AST, ALT, LDH, Fosfatasi alcalina e Isoenzimi della fosfatasi alcalina.

Epicrisi clinica Sulla base dei dati clinici e degli esami di laboratorio forniti e richiesti l'ipotesi più probabile è di "**Sindrome colestatica**". **Quest'ipotesi è stata fornita dal 76% dei laboratori**

2° caso clinico: funzionalità renale.

Paziente di 68 anni, iperteso, ricoverato più volte in Reparti di Nefrologia, anche in questo caso vengono forniti al laboratorio i risultati di alcuni esami ematochimici

Parametri biochimici richiesti:

Urea, Creatininemia, Glicemia, Protidemia tot, Na, K, Cl, Ca, P.

Epicrisi clinica

Sulla base di quanto riportato nella richiesta e in base all'analisi dei parametri biochimici, l'ipotesi più probabile è quella di una **insufficienza renale cronica**. La risposta è stata fornita correttamente dal 94% dei laboratori, solo il 2% ha ipotizzato una insufficienza renale acuta.

Importante in questa fase il ruolo svolto dal laboratorio, infatti la distinzione si opera valutando da un lato il **rapporto urea/creatininemia** e dall'altro rilevando i segni biochimici di un danno renale stabilizzato sulla **crasi ematica**, sull'equilibrio calcio-fosforo e sull'assetto elettrolitico ed acido-base.

In conclusione in entrambi i casi la valutazione delle diagnosi fornite ha messo in evidenza un'ottima capacità di inquadramento delle problematiche clinico-laboratoristiche.

244

USEFULNESS OF PROGNOSTIC INFLAMMATION-NUTRITIONAL INDEX (PINI) ASSESSMENT IN HEMODIALYSIS PATIENTS

Dessi M. , De Angelis S. °, De Angelis L. , Luciani V.* , Ferrannini M. °, Agnoli A. * , Naticchia A. °, Martore C.* , Casalino P.* , Federici G.*

*Laboratory Medicine, °Nephrology and Dialysis, University Hospital "Tor Vergata" Rome , Italy"

Background Malnutrition and inflammation are common occurrences in hemodialysis (HD) patients and both are reported to increase mortality and aggravate concomitant diseases such as cardiovascular disease (CVD). A laboratory-based nutrition screening process, prognostic and nutritional index (PINI) defined, in which four plasma proteins indicative of nutritional status and/or inflammation have been evaluated. Nutritional assessment was based on: serum Albumin, Prealbumin, and two specific plasma proteins of acute phase reaction: C-reactive protein and $\alpha 1$ Acid Glycoprotein ($\alpha 1$ AG).

Aim of our study was: 1) to assess the sensitivity and specificity of these plasma proteins compared to Body mass index (BMI). 2) to research the possible correlation with cardiovascular disease in HD patients.

Patients and Methods

Fifty two patients undergoing maintenance hemodialysis for a mean time of 7.81 ± 6.75 years have been studied, 32 men and 20 women, aged 59.64 ± 14.75 years. BMI (Kg/m^2) were performed. PINI was calculated by : $\alpha 1$ AG x PCR/ Alb x Prealb.

Results ROC curves between patients with the following cut off: PINI = 1, BMI = 18.5 , showed that area under PINI curve is significantly higher than area under albumin curve. Sensitivity of PINI resulted 92.2% versus 88.3% of the BMI. Specificity of both was the same (89.6%), demonstrating a higher power of PINI in the early diagnosis of malnutrition.

About the correlation with CVD, 14 patients (26.9 %) had signs of CVD.

The only one CRP was elevated in 31 patients (59.6 %), and $\alpha 1$ -AG was elevated in 14 patients (26.9 %), confirming a strong association between cardiovascular disease and inflammation in HD patients.

1) Kalantar-Zadeh K et al. Am J Kidney Dis.38(6): 1251-63, 2001.

245

INTERFERENZA NEL DOSAGGIO DEL GLUCOSIO PLASMATICO: UN CASO RISOLTO

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

Scopi: vogliamo evidenziare un problema di interferenza analitica sul dosaggio del glucosio ematico in una paziente che mostrava variazioni significative a seconda del metodo utilizzato.

Metodi e risultati: viene eseguita la glicemia ad una paziente di anni 70 già affetta da linfoma ricoverata per nausea e malessere generalizzato nel reparto di 2° medicina del nostro ospedale. Il valore glicemico, ottenuto con strumento Olympus AU2700 (reazione con esochinasi) risulta essere di 34 mg/dl. Viene informato del dato il collega internista che riferisce la mancanza di un riscontro clinico e ci informa che la glicemia misurata contestualmente (in reparto) mediante Glucometer (metodo con glucosio ossidasi) mostra un valore di 90 mg/dl. L'emocromo non presenta una conta cellulare che possa spiegare un abbassamento così marcato della glicemia.

Viene chiesto al collega di inviare un nuovo campione che processato con lo strumento Olympus fornisce un valore di 40 mg/dl, mentre con Beckman-Coulter Synchron LX20 (metodo con glucosio ossidasi) risulta di 96 mg/dl; lo stesso campione misurato con il Glucometer del nostro ambulatorio fornisce un valore di 98 mg/dl. Vengono ripetute le determinazioni ma i risultati sono confermati. La paziente non presenta iperlipemia, ittero od emolisi in grado di interferire con il metodo utilizzato da Olympus; il medico di reparto riferisce che alla paziente è stato somministrato acido ascorbico che in concentrazioni superiori a 20 mg/dl interferisce fortemente sul metodo Olympus (1).

Conclusioni: considerando l'interferenza sullo strumento biochimico di routine (Olympus) la soluzione adottata è stata quella di determinare la glicemia della paziente con lo strumento LX20 (presso il settore urgenze del nostro Laboratorio) che non risente dell'ascorbato presente nel plasma. Nonostante l'alto grado di affidabilità raggiunto dalla strumentazione per la chimica clinica possono ancora verificarsi fenomeni che devono far comunque riflettere sulla necessità di una attenta valutazione dei risultati anomali, soprattutto se non correlabili al quadro clinico del paziente.

Bibliografia: 1) Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed AACC Press, 2000.

247

UTILITA' CLINICA DEL LABORATORIO NEL CORRETTO INQUADRAMENTO DI SINDROMI DA ALTERATO RICAMBIO MARZIALE.

Vandini D.; Bianchi G.; Stocchi O.
U.O. Laboratorio Analisi Ospedale di Urbino – ASUR
Zona Territoriale 2 - 61029 URBINO (PU)

Introduzione: In diverse condizioni morbose l'apporto di ferro al tessuto eritroide del midollo osseo può risultare inadeguato e quindi giungere all'eritrona una quantità di ferro insufficiente che compromette la produzione di emoglobina (Hb). La suddetta carenza marziale può essere assoluta o funzionale.

Obiettivi: Valutazione del potere predittivo e della concordanza di nuovi parametri ematologici quali il CHCM e la % di IPO (eritrociti ipocromici), valori determinati e non calcolati, con tests classici; studio del comportamento di CHCM e di % IPO nei quadri clinici considerati; verifica del grado di correlazione tra MCHC (valore calcolato) e CHCM e tra MCH (valore calcolato) e CH (valore determinato).

Materiali e metodi: Nel periodo maggio-novembre 2004 sono stati selezionati mediante il modello a posteriori 51 pazienti sia degenti che ambulatoriali con quadri clinici di alterato ricambio marziale. Su di essi si sono valutati i seguenti parametri: MCV, MCH, MCHC, CH, CHCM, RDW, Globuli Rossi, Hb, Sideremia, TFR, Ferritina, % IPO, % FSAT. I valori degli indici eritrocitari vengono ottenuti mediante ADVIA 120 E.S. (metodo elettroottico, principio operativo della citometria a flusso). Le informazioni ottenute vengono rappresentate con istogrammi di distribuzione, dai quali si calcolano l'MCV (media dell' istogramma VC-RBC) e relativa % RDW, il CHCM (media dell' istogramma HC-RBC) e %IPO cioè di eritrociti con contenuto di Hb < 28 gr/dL derivato dall' istogramma HC-RBC.

Risultati: L'Hb si è confermata parametro insostituibile per caratterizzare la condizione di anemia. Il test ferritina ha dimostrato concordanza del 100% in tutte le sindromi. Il parametro % IPO ha fornito ottima % di concordanza. La valutazione statistica, Retta di Regressione Lineare Standard dei risultati ottenuti tra MCHC e CHCM ha fornito indice di correlazione: $r=0,945$ e tra MCH e CH $r=0,993$. Il t di Student per dati appaiati non ha rivelato differenze significative $p=0,291$ per MCHC e CHCM e $p=0,010$ per MCH e CH.

Conclusioni: Si dimostra il ruolo insostituibile degli esami di laboratorio nella diagnosi e classificazione delle sindromi correlate ad alterato ricambio marziale e si evince che valori patologici del parametro %IPO (> 10%) si riscontrano non solo nella Anemia Sideropenica, dove c'è carenza reale di Fe^{++} in tutti i distretti, ma anche in quelle condizioni dove la carenza è funzionale, come nell'Anemia da Disordini Cronici. Infatti in tale evenienza il Fe^{++} non si rende disponibile nella sede dell'Eritropoiesi pur essendo abbondante nei distretti di deposito.

Ref: Macdougall IC. Monitoring of iron status and iron supplementation in patients treated with erythropoietin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3:620-25.

248**IPONATREMIE NEI PAZIENTI OSPEDALIZZATI PRESSO L'AZIENDA OSPEDALIERA SAN GERARDO DI MONZA.**

Casati M.¹, Rivera R.², Colombo S.¹, Perlangeli V.¹, Delfini C.¹, D'Onofrio I.¹, Fossati L.¹, Novati N.¹, Regina M.G.¹, Pittalis S.¹
¹ U.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, ² U.O. Clinica Nefrologica, A.O. S. Gerardo di Monza, Via Pergolesi 33, 20052 Monza.

Scopi e obiettivi

L'iponatremia (ipo-Na) è il disturbo elettrolitico più comune nei pazienti (pz) ospedalizzati (1) e si associa ad elevata morbimortalità. Scopo del lavoro. Analisi retrospettiva di: incidenza, eziologia, gestione clinica ed indici di mortalità delle ipo-Na rilevate nei pz ricoverati presso il nostro ospedale nell'anno 2003.

Metodologia usata

Gli elettroliti e l'osmolarità, plasmatica ed urinaria, il reparto di provenienza e la diagnosi di dimissione del pz sono stati estratti dai database ospedalieri. Sono state escluse sodiemie con errori preanalitici e pseudoiponatremie. Sulla base dei cut-off presenti in letteratura sono state individuate due popolazioni. Gruppo A: pazienti con almeno una sodiemia > 120 e ≤ 130 mmol/L; gruppo B: pazienti con almeno una sodiemia ≤ 120 mmol/L (ipo-Na grave). Sono state analizzate le cartelle cliniche del gruppo B al fine di classificare clinicamente lo stato del volume extracellulare del pz al momento della diagnosi, secondo uno schema precedentemente stabilito (1). I dosaggi sono stati eseguiti con Analizzatore Modular PP (Roche-Hitachi, Metodo: ISE potenziometria indiretta).

Risultati

Sono stati valutate 96914 sodiemie in 31500 pz. Nel gruppo A sono stati inclusi 720 pz, nel gruppo B 41 pazienti, pari ad una incidenza di Ipo-Na intraospedaliera del 2.4% (gruppo A), e dello 0.15% (gruppo B). Non sono emerse differenze significative tra età e sesso. La mortalità intraospedaliera aumenta proporzionalmente con l'entità del disturbo: 15.6% vs 29.2% rispettivamente (gruppo A vs B). Le ipo-Na nel gruppo A provenivano nel 44% dei casi dal dipartimento medico, nel 23% dal chirurgico, nel 17% dal materno-infantile, nel 13% dall'onco-ematologico, nel 3% dall'emergenza-urgenza. I quadri clinici dell'ipo-Na gravi risultavano associati a situazioni euvolemiche nel 14% dei casi, ipervolemiche nel 42% ed ipovolemiche nel 44%. Nel gruppo B, sono stati utilizzati ulteriori accertamenti diagnostici per l'identificazione del tipo di ipo-Na (sodio urinario, osmolarità plasmatica ed urinaria) solo nel 25% dei casi.

Conclusioni

L'incidenza di ipo-Na nel nostro ospedale risulta analoga a quanto descritto in altre realtà ospedaliere (2-3). La diversità nella distribuzione delle ipo-Na nei diversi dipartimenti, rispetto a quanto descritto in letteratura sarebbe imputabile alla eterogeneità del campione. Si rileva una scarsa richiesta di accertamenti complementari per migliorare l'inquadramento del disturbo elettrolitico da parte di tutti i settori ospedalieri rispetto a quanto segnalato in letteratura. E' necessario un approccio multidisciplinare nella gestione clinica dell'ipo-Na ai fini di migliorare le conseguenze di tale complicità.

Riferimenti bibliografici

- 1) Gennari F.J. (1998) Oxford textbook of clinical nephrology, Oxford University Press, 175-200.
- 2) Saeed B.O. et al. J Clin Pathol. (2002) 55, 893-6
- 3) Nzerue C.M. et al. J Natl Med Assoc (2003) 95, 335-43

249**MARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE IN WORKERS OF TRAVERTINE QUARRIES IN ITALY**

Gozzo M.L., Callà C., Colacicco L., Lippa S., De Sole P., Giardina B., Mormile F*.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica e Istituto di Fisiopatologia Respiratoria*, Università Cattolica del S. Cuore Roma.

Inhaled inorganic dust behaves as secondary oxidants in that activate macrophages and neutrophils to release reactive oxygen species (ROS).

The frequency of respiratory tract diseases and BPCO in travertine workers is elevated.

The aim of this study was to prove that in workers of travertine industry an oxidative stress occurs and to correlate this with the degree of airflow obstruction.

Methods: we studied a group of 138 travertine industry workers, a group of 37 retired travertine workers and a group of 67 control subjects.

The variables measured were: Reactive oxygen species (ROS) (d-ROMs test DIACRON Italia s.r.l.), Zinc (colorimetric method LTA s.r.l. Milan), polymorphonuclear leucocytes functionality (De Sole et al.), plasma SH according to G. Ellman, enzymatic activity of Glutathione peroxidase (kit Randox laboratories Ltd), CoQ₁₀ (HPLC according to Lippa et al), Glutathione (HPLC according to Araki e Sako).

Results and Conclusions: a very significant increase of ROS, CoQ₁₀, Zn and Lucigenine chemiluminescence with a concomitant decrease of GPX and glutathione was observed in travertine workers compared with normal controls whereas the retired workers showed a marked decrease of CoQ₁₀, GPX, glutathione and a significant increase of ROS.

From this data an increased production of ROS in the lung cells, caused by leukocyte activation could be hypothesized. Furthermore this peroxidative insult could trigger the release of CoQ₁₀ and Zn from damaged cells and an active transport of both glutathione and GPX from serum into the cells. A similar pattern is still present even though to a lesser extent in the retired workers. However in this case a decrease of CoQ₁₀ was observed probably since the peroxidative insult is not able to trigger a release of this molecule.

References

- De Sole et al Biochim. Chemilumin. Roda, Pazzagli, Kricka, Stanley eds, pag 247-250, Chichister 1999.
- G. Ellman Arch. Biochem Biophys. 82,70, 1959
- Lippa et al. Atti della 1° Conferenza Nazionale su "La cromatografia liquida ad alta risoluzione in analitica clinica: situazione attuale e prospettive". Verona 1985 pag.51.
- to Araki e Sako J Chromatogr. 1987; 422: 43-52.

250**FATTORI PREDITTIVI PER COMPLICANZE SCHELETRICHE IN PAZIENTI CON METASTASI OSSEE DA CARCINOMA PROSTATICO ORMONO REFRATTARIO**

Aroasio E.; Torta M.; Tucci M.; Vana F.; La Manna G.; Mosca A.; Poggio M.

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino, Oncologia Medica, Urologia. ASO S.Luigi, Regione Gonzole 10, 10043 ORBASSANO

Al fine di evidenziare i fattori predittivi per SREs (skeletal related events), nei pazienti affetti da tumore prostatico portatori di metastasi ossee (BMPC) e refrattari alla terapia ormonale, abbiamo valutato la frequenza di SREs in 200 pazienti con BMPC refrattari alla terapia ormonale; questi pazienti sono stati seguiti fino alla data dell'ultimo "follow up" o alla data di morte presso la Prostate Cancer Unit, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche Università degli Studi di Torino, Azienda Ospedaliera San Luigi, Orbassano. I parametri di partenza, al momento di entrata nello studio, sono stati studiati con analisi univariata e multivariata come potenziali fattori predittivi per SREs e si è utilizzato SPSS come programma di analisi statistica. In 84 pazienti (43.0%) hanno sviluppato SREs di cui 10 (5.0%) presenti prima dell'inizio della refrattarietà alla terapia ormonale. I parametri che correlavano, all'analisi univariata, con un rischio elevato di incorrere in SREs sono: PPS (patient performance status) ($P=0.002$), BED (estensione della malattia ossea) ($P=0.0001$), BP (dolore osseo) ($P=0.0001$), s-ALP (fosfatasi alcalina serica) ($P=0.0001$) e NTx urinario ($P=0.0001$); al contrario non correlavano i seguenti parametri: classificazione di Gleason (Gleason score), antigene prostatico specifico serico (s-PSA), emoglobina (s-Hb), albumina serica (s-Albumina), calcio serico (s-Ca), durata della terapia anti androgena e tipo delle lesioni scheletriche. Sia l'estensione della malattia [Hazard Ratio (HR) 1.16, il 95% intervallo di confidenza (C.I.) 1.07-1.25, $p=0.000$] che la classificazione del dolore (pain score) [HR 1.13, 95% C.I. 1.06-1.20, $p=0.000$] risultavano all'analisi multivariata come variabili indipendenti nel predire la comparsa di SREs. Le SREs nei pazienti con pesante coinvolgimento tumorale scheletrico ed elevato dolore osseo erano circa doppie (26% contro 52%, $p<0.02$) ed insorgevano prima ($p=0.000$) che nei pazienti con limitata estensione tumorale ossea e scarso dolore osseo.

In conclusione il dolore osseo e l'estensione della malattia tumorale scheletrica sono predittive in modo indipendente dell'insorgenza di SREs nei pazienti con tumore prostatico metastatizzato non rispondente alla terapia ormonale.

I marcatori di turnover osseo correlano, notoriamente, con l'estensione di malattia e pertanto non mostrano un ruolo predittivo indipendente.

251**GENDER DIFFERENCE IN NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORPHISM IN YOUNG HEALTHY SUBJECTS**

Ciofini E., Paradossi U., Colombo M.G., Manfrini O. Bugiardini R., Clerico A., Biagini A.

CNR Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Via Aurelia SUD, 54100 Massa, Italy

Background. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) regulates endothelial function. Endothelial dysfunction may play a role in the development of atherosclerosis. **Aim.** We conducted a gender-specific clinical investigation to assess the role of eNOS polymorphism as predisposing factor for attenuation of endothelial function and early sub-clinical atherosclerosis in young people.

Methods. We enrolled 146 young healthy subjects free of traditional risk factors (diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking). Genotyping for the eNOS Glu298Asp polymorphism was performed by polymerase chain amplification. We used high-resolution ultrasounds to assess brachial artery flow-mediated endothelium-dependent dilation (FMD) and carotid artery intima-media thickness (IMT). The former is a marker of endothelial function, the latter is an index of sub-clinical atherosclerosis.

Results. Of the 146 subjects 72 were female (F, 29.7 ± 4.9 year/old) and 74 were male (M, 31.6 ± 6.8 year/old). Genotypic proportions were in Hardy-Weinberg equilibrium with the frequency of Glu/Glu 44%, Glu/Asp 43%, and Asp/Asp 13% being similar to that observed in previous studies. There was not significant difference in the distribution of Glu298Asp polymorphism between genders. In women, Asp-carriers had a significantly lower FMD than Glu298-homozygotes (13.4 ± 6 % versus 16.5 ± 7.1 %, $p<0.05$). In men, there was no difference in FMD between Asp-carriers and Glu298-homozygotes (11.1 ± 4.6 % versus 10.0 ± 5.2 %; $p=ns$). FMD correlated inversely with carotid IMT ($r=-0.29$, $p<0.01$).

Conclusions. Glu298Asp polymorphism is associated with gender differences in endothelial function and sub-clinical atherosclerosis in young healthy subjects. Women with Glu298-homozygotes present better endothelial function than does women with Asp-carriers. Men had the worst endothelial function that may be relevant to early development of clinical disease. eNOS Glu298Asp polymorphism may contribute to gender difference in the incidence of cardiovascular disease.

252**SUPEROXIDE DISMUTASE AND VASCULAR INFLAMMATION IN CORONARY ARTERY DISEASE**

Lubrano V., Di Cecco P., Zucchelli G. C.
Istituto di "Fisiologia Clinica, CNR", via Moruzzi 1,
56100 Pisa

Superoxide dismutase (SOD) is reported to be the major enzymatic defence against free radicals and common oxidant. EC-SOD is the only extracellular form of SOD present at a high concentration in vascular intima. The aims of the present study were to elucidate the role of EC-SOD in patients with coronary artery disease (CAD) and its association with free radicals, inflammation and with the severity of the disease.

The study included 34 consecutive subjects with CAD being treated in the Institute of Clinical Physiology (31 males and 3 females, age range 46-84 years) and 19 controls (16 males and 3 females, age range 39-75). Each subject, after cardiac catheterisation and coronariography were evaluated for serum EC-SOD activity, peroxy-radicals, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF α), and C-reactive protein (CRP) serum levels.

The analysis of EC-SOD serum activity did not show any particular difference between patients and controls, while the serum levels of peroxy radicals, IL-6 and CRP showed a significant difference between the two groups (respectively: $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.01$). Moreover, enhancement of IL-6 serum levels was also observed in severe disease (involvement of 3, 4 coronary arteries; $p < 0.05$). IL-6 concentrations were statistically significantly associated with peroxy-radicals and CRP levels (respectively : $p < 0.05$, $r^2 = 0,1$; $p < 0.05$, $r^2 = 0,14$).

The present study suggests the low effectiveness of EC-SOD in CAD and confirms the importance of IL-6, a useful marker in diagnostic prevention and in clinical characterization of CAD

253**NITROSATIVE STRESS, CELLULAR STRESS RESPONSE AND THIOL HOMEOSTASIS IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE**

Calabrese V.¹; Rucksana S.³; Guagliano E.¹; Spadaro F.¹; Sapienza M.¹; Bella R.²; Pennisi G.²; Scapagnini G.⁴; Alkon D.⁴; Butterfield D.A.³ and A.M. Giuffrida Stella¹.

¹Dept. of Chemistry, and ²Dept. of Neurological Sciences, University of Catania, Italy; ³Dept. of Chemistry, University of Kentucky and ⁴Rockefeller Neuroscience Institute, Washington, USA.

Oxidative stress has been implicated in mechanisms leading to neuronal cell injury in various neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease (AD) is a progressive disorder with cognitive and memory decline, speech loss, personality changes and synapse loss. Many approaches have been undertaken to understand AD, but the heterogeneity of the etiologic factors makes it difficult to define the most important factor determining the onset and progression of the disease. Increasing evidence indicates that factors such as oxidative stress, glutathione (GSH) depletion and impaired protein metabolism can interact in a vicious cycle, which is central to AD pathogenesis. Moreover, nitric oxide has been hypothesised to play a role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Peroxynitrite, generated by the reaction of nitric oxide (NO) with superoxide at sites of plaques, is a strong oxidant capable of inducing neuronal cell damage. As consequence, brains of AD patients, undergo many changes, such as alteration of protein synthesis and degradation, classically associated with the heat shock protein induction, which is one form of stress response. Heat-shock proteins are molecular chaperones involved in the protection of cells from various forms of stress. Recently, the involvement of the heme oxygenase (HO) pathway in anti-degenerative mechanisms operating in AD has received considerable attention, as it has been demonstrated that the expression of HO is closely related to that of amyloid precursor protein (APP). HO induction, which occurs together with that of other HSPs during various physiopathological conditions, by generating the vasoactive molecule carbon monoxide and the potent antioxidant bilirubin, represents a protective system potentially active against brain oxidative injury. In the present study we investigated the role of nitrosative stress, and the relationship with the antioxidant status and cellular stress response in brain and blood of AD patients, compared with age-matched healthy volunteers as control group. By western blot analysis with specific antibodies, we demonstrate in brain of AD patients a significant increase in the expression of HO-1, thioredoxin reductase and Hsp60, associated with a decrease in the expression of HO-2. Plasma content of GSH, protein (P-SH) and non 253

protein (NP-SH) sulfydryl groups were decreased in AD patients, compared to control group, and these

253

changes were associated with a significant increase in the oxidative stress markers GSSG, hydroxynonenals (HNE), carbonyl content and nitrotyrosine, as a marker of nitrosative stress. In AD lymphocytes we found a significant increase in the expression of inducible nitric oxide synthase (NOS-2), heme oxygenase-1, Hsp70 and carbonic anhydrase. Moreover, a significant decrease in the expression and activity of the vitagene thioredoxin reductase was observed. Our data support a role for nitrosative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and indicate that therapeutic strategies such as antioxidant treatment and/or modulation of stress responsive genes, such as heme oxygenase and thioredoxine reductase, may represent an important target for novel cytoprotective strategies useful to alleviate the neurological impairments associated with neurodegenerative damage occurring in AD and other brain diseases.

254

EFFETTI A BREVE TERMINE SUL PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B DI UNA TERAPIA A BASSO DOSAGGIO DI CARVEDILOLO IN PAZIENTI CON GRAVE DISFUNZIONE VENTRICOLARE SINISTRA

Lazzerini S., Minneci C.*, Martelli C., Verdelli M.*, Sarti A.*, Doni L.

Laboratorio Chimica Clinica – *Ambulatorio
Scompenso Cardiaco
Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio, Via di
Torregalli 3, 50143 Firenze

Scopo del Lavoro

I livelli plasmatici del Peptide Natriuretico di tipo B (BNP) sono correlati con il grado di disfunzione ventricolare sinistra (LVD) e con la prognosi nei pazienti con scompenso cardiaco cronico (CHF). E' stato dimostrato che la terapia con beta-bloccanti (BB) riduce la mortalità e le ospedalizzazioni in tali pazienti; il beneficio appare evidente anche con bassi dosaggi di BB, ma non è ancora chiaro l'effetto sui livelli di BNP. Abbiamo verificato gli effetti di basse dosi di carvedilolo (BB) sull'equilibrio neurormonale dei pazienti con grave LVD.

Materiali e metodi

Abbiamo selezionato tra 172 pazienti con severa LVD (EF < 0.30) quelli con 2 o più valutazioni del BNP (ADVIA Centaur, Bayer) dopo l'inizio della terapia con carvedilolo, trattati con la dose più alta tollerata di ACE inibitori in accordo con le recenti linee-guida europee sul trattamento del CHF. Abbiamo eseguito un follow up di 6 mesi a 15 pazienti (13 M e 2 F, età media 69 anni), tutti euvolemici e senza variare il dosaggio diuretico durante il periodo di osservazione. L'eziologia era: ischemica in 9 pazienti, primitiva in 4, ipertensiva in 2. Dodici pazienti classificati NYHA II, tre NYHA III. La dose iniziale di carvedilolo è stata di 3,125 mg due volte al giorno, portandola fino al massimo tollerato in accordo con le linee-guida.

Risultati

Dodici pazienti hanno mostrato una riduzione dei livelli di BNP dopo l'inizio del trattamento (media: 3 settimane). Un paziente ha sospeso il trattamento per l'aggravarsi dello scompenso cardiaco e due per scarsa compliance (livelli di BNP aumentati). Durante il follow up la EF, i diametri, i volumi ventricolari e la classe funzionale NYHA sono rimasti invariati.

Conclusioni

I nostri dati preliminari dimostrano l'efficacia di bassi dosaggi di carvedilolo nel migliorare lo stato neurormonale dei pazienti con grave LVD, nonostante i parametri clinici ed ecocardiografici rimangano invariati. Il BNP potrebbe essere il parametro che seleziona quei pazienti apparentemente stabili che potrebbero avere prognosi peggiore. Le variazioni positive dello stato neurormonale potrebbero indicare un ulteriore meccanismo per spiegare gli effetti benefici del carvedilolo anche a bassi dosaggi terapeutici in pazienti con CHF e severa LVD

255

EMOGASANALISI NEONATALE: ESPERIENZA DI UN OSPEDALE DI RETE

Miatton M.*, Sirianni F.*, Zompicchiatti C^o., Madonia T^o., Lazzi C*., Della Vedova B*.

*U.O. Laboratorio Analisi, ASS n. 5 "Bassa Friulana", Ospedale di Palmanova (UD)

^oU.O. Ostetricia e Ginecologia, ASS n. 5 "Bassa Friulana", Ospedale di Palmanova (UD)

Introduzione La diagnosi post-partum di asfissia neonatale viene valutata attraverso l'indice di Apgar, che però presenta alcuni limiti: un basso valore, preso singolarmente, non indica asfissia fetale; non è predittivo di esiti neurologici infausti; risente dell'esperienza dell'operatore. L'emogasanalisi eseguita dall'arteria ombelicale riflette l'equilibrio acido-base al momento della nascita; valori normali di pH escludono la diagnosi di asfissia neonatale in circa l'80% dei neonati depressi a termine, e ciò riveste importanza non solo per le sequele cliniche, ma anche per le eventuali implicazioni medico-legali legate agli esiti asfittici neonatali. Scopo del lavoro: valutare l'attendibilità dell'equilibrio acido-base neonatale (pH e ABE) rispetto all'indice di Apgar.

Materiali e metodim Dal 1° marzo al 27 giugno 2005 sono stati analizzati 219 campioni di sangue arterioso ombelicale, ottenuti dopo la fuoriuscita del feto e prima del secondamento. Il sangue è stato raccolto in siringhe eparinate del commercio, posto in ghiaccio e portato ad analizzare al più presto. L'emogasanalisi è stata eseguita utilizzando lo strumento Bayer Rapidpoint 405. Per tutti i neonati è stato valutato l'indice di Apgar.

Risultati

Neonati esaminati (tutti vitali) = 219

Apgar	Apgar NEGATIVO	Apgar POSITIVO	SPECIFICI TA'
CUT OFF ≤ 6	202	17	93%

pH	pH NEGATIVO	pH POSITIVO	SPECIFICI TA'
CUT OFF ≤ 7	215	4	98%

ABE	ABE NEGATIVO	ABE POSITIVO	SPECIFICI TA'
CUT OFF ≤ - 12	207	12	95%

Discussione e conclusioni Dai risultati ottenuti è stata calcolata, per i tre parametri presi in considerazione, solo la specificità, ma non la sensibilità, poiché non è stato rilevato alcun risultato vero positivo, evento poco frequente nella nostra realtà. Si può concludere che sia l'indice Apgar che i parametri dell'emogasanalisi possono dare, in misura diversa, risultati falsi positivi, e che il pH ha la specificità più elevata. Inoltre il campione per l'emogasanalisi è facile da ottenere, il test è poco costoso, i risultati si ottengono in breve tempo e si dispone di un dato oggettivo, che non risente dell'esperienza dell'operatore. Sarebbe dunque opportuno utilizzare il pH neonatale rispetto all'indice di Apgar, come risulta anche dalla letteratura.

256

SERUM LEVELS OF SEVEN CYTOKINES IN PREMATURE NEWBORNS TREATED WITH TWO VENTILATORY PROCEDURES: HFOV AND SIMV.

¹Capoluongo E.; ²Vento G.; ¹Concolino P.; ¹Santoncico C.; ²Matassa P.G.; ²Romagnoli C.; ¹Giardina B.; ¹Zuppi C.; ¹Ameglio F.

(¹) Department of Biochemistry & Clinical Biochemistry and (²) Division of Neonatology - Catholic University of the Sacred Heart, 00168, Rome, Italy.

Objective: Severity of pulmonary dysfunction and later development of chronic lung disease in preterm neonates depends on several factors, including oxygen administration. Aim of this report is to compare the effects of high-frequency oscillatory ventilation (HFOV) versus synchronised intermittent mandatory ventilation (sIMV) on serum cytokine levels (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, PDGF-BB, VEGF and TGF-beta1) and respiratory indices during the first week of life. Consequently, chronic lung disease development and several other outputs have been compared between the two groups.

Design: Randomized clinical trial. **Setting:** Third level NICU. **Patients:** 40 preterm neonates with a gestational age between 24 and 29 weeks were randomly (20 per group) assigned to one of the two above-mentioned ventilation strategies within 30 minutes from birth. **Results:** At 1, 3 and 5 days, 34/40 babies were monitored for their ventilator indices and 7 pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines in sera. No clinical or biochemical differences were observed at baseline. Sixteen neonates assigned to HFOV benefited from early and sustained improvement in gas exchange with earlier extubation, as compared to 18 neonates assigned to sIMV treatment, and showed a significant reduction of serum IL-6, IL-8 and IL-10 over time only when the HFOV treatment was administered. At days 3 and 5, the IL-6 levels were significantly lower in the HFOV group as compared to sIMV patients. **Conclusions:** These results support the hypothesis that an early use of HFOV, combined with an optimum volume strategy, has a beneficial effect, reducing serum levels of pro-inflammatory cytokines and the acute phase leading to lung injury (oxygen dependency at 36 weeks was significantly higher in the sIMV group).

257

EFFECTS OF ALTERNATE SUPPLEMENTATION WITH FOLIC ACID AND VITAMIN B₁₂ ON HOMOCYSTEINE LEVELS IN HD PATIENTS.

Casciani S.* , Pastore A. §, De Angelis S. °, Ruggia R.* , Zenobi R.* , Di Giovamberardino G. §, Federici G.* , Dessì M.*
 *Laboratory Medicine, °Nephrology and Dialysis, University Hospital “Tor Vergata” Rome , Italy“
 §Biochemistry Laboratory, Children’s Hospital and Research Institute “Bambino Gesù”,

Background

Hyperhomocysteinemia is frequently found in HD patients. In most studies, >90% of dialysis patients have elevated levels of Hcy.

The aim of the study was to explore the effect of one by one supplementation with folic acid and vitamin B₁₂ on homocysteine plasma levels, correlated to MTHFR polymorphism in hemodialysis patients.

Materials and Methods: One hundred forty-eight patients were recruited from the “Umberto I” Hospital (Frosinone, FR, Italy) and from Dialysis Unit of University Hospital “Tor Vergata”. The patients have been randomized in two groups. The 1th group was treated at first with vitamin B₁₂ for two months, and the with folic acid for other two months, whereas the 2nd group was supplemented at first with folic acid and then with Vitamin B₁₂. After the second step of the study began a stop period for other two months.

Vitamin B₁₂ and folate levels were detected by using an automated chemiluminescence system on Centaur (Bayer). Total Hcy levels were assayed using a fully automated HPLC method with fluorimetric detection. MTHFR genotyping was based on PCR amplification and restriction cleavage.

All statistical analyses were performed by the statistical package SPSS for Windows.

Results: tHcy levels decreased in all groups, and are genotype-dependent. Indeed, the decrease is more accentuated for the T/T genotype, respect to the other genotypes, and is more evident when the treatment start with folic acid instead of vitamin B₁₂. Surprisingly, the tHcy concentrations after vitamins treatment suspension were higher than the initial values, except for the C/C patients of both groups, demonstrating that the influence of MTHFR mutation on plasma tHcy levels depends upon the vitamin chosen for first supplementation.

Conclusion: Accordingly with Bostom et al. (1), our study we confirmed the relationship between hyperhomocysteinemia and folate treatment in hemodialysis patients. In addition, we demonstrated for the first time, with the one by one supplementation. the importance of folate therapy and the secondary contribution of vitamin B₁₂ in HD patients. The folic acid and vitamin B₁₂ request is strictly correlated to MTHFR genotype.

1) Bostom AG. et al. *Circulation* 2000; 101:2829-2832.

258

VALUTAZIONE DEL COMPLESSO MALNU-TRIZIONE-IFIAMMAZIONE E DELLO STRESS OSSIDATIVO IN SOGGETTI EMODIALIZZATI

Bondanini F., Palumbo R., Cocciolillo G.C., Fumagalli E., Galliani M., Calabria S., Paone A., Fusco A.
 U.O.C. Biochimica Clinica, *U.O.C. Nefrologia, Dialisi e Litotrissia, Ospedale “S. Pertini”, Roma

Nel paziente uremico in trattamento dialitico è stata descritta una stretta correlazione tra la malnutrizione e l’infiammazione, entrambe associate a un incremento della morbilità, della mortalità e del rischio di patologia cardiovascolare. Il trattamento emodialitico può, di per sé, determinare un aumento dello stress ossidativo (SO); alcuni Autori ipotizzano che la rimozione di molecole ad azione ossidante bilancerebbe la generazione di radicali liberi.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, in un gruppo di 10 soggetti in trattamento emodialitico cronico periodico, l’effetto di tre metodiche dialitiche diverse, con crescente capacità di rimozione di sostanze a medio peso molecolare, sul complesso malnutrizione-infiammazione (CMI) e sullo SO. In particolare, l’ipotesi da noi formulata, è che a una più efficace rimozione di molecole a medio peso, rappresentate dalla β₂-microglobulina, corrisponda una diminuzione dei livelli di SO e quindi un miglioramento dello stato infiammatorio e nutrizionale.

10 pazienti (4 maschi, 6 femmine) venivano sottoposti, per tre periodi consecutivi di 6 settimane ciascuno, a tre tipi diversi di trattamento emodialitico e precisamente, in successione, a: 1) bicarbonato dialisi (filtro utilizzato polisulfone a basso flusso); emodiafiltrazione on-line ed emofiltrazione on-line (filtro utilizzato Helixone ad alto flusso, Fresenius Medical Care). Al termine di ogni ciclo di trattamento, per ciascun paziente, è stato prelevato un campione di sangue, su cui sono stati dosati: derivati dei metaboliti reattivi dell’ossigeno (Diacron, Grosseto), β₂-microglobulina, albumina, PCR con metodica ultrasensibile. L’analisi statistica è stata condotta con l’analisi della varianza per misure ripetute, il test del chi quadro e l’indice di correlazione r di Pearson.

Le metodiche convettive sono più efficaci nella rimozione di medie molecole e di radicali liberi (p<0,01). Il CMI, valutato mediante la combinazione dei livelli plasmatici dell’albumina e della PCR ultrasensibile, migliora notevolmente in seguito al ciclo di trattamento con le metodiche convettive on-line (p=0,011).

In conclusione, è possibile affermare da queste valutazioni preliminari come la metodica convettiva sia più efficace nel rimuovere molecole ad azione proossidante. Risulta inoltre evidente come i parametri che descrivono il CMI vengano sensibilmente corretti in seguito a trattamento convettivo on-line. In definitiva, è possibile ipotizzare, in seguito a tali risultati, che le metodiche convettive, rispetto a quelle diffusive, possano svolgere un ruolo importante nello sviluppo e nel decorso delle patologie cardiovascolari del paziente uremico in trattamento sostitutivo.

259

VALORI DI RIFERIMENTO DELLA VITAMINA B6 IN UN GRUPPO DI VOLONTARI ROMANI

Scribano D., Persichilli S., Minucci A., Fasanella S., Neri P., Giardina B., Zappacosta B*.
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica-UCSC – Roma. *Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del Sacro Cuore - Campobasso

Obiettivi. Nell'ambito dei fattori di rischio cardiovascolare, l'iperomocisteinemia (HHcy), sta sempre più consolidando il suo ruolo. L'omocisteina (Hcy) tuttavia riveste importanza anche come marker funzionale di carenza di alcuni fattori nutrizionali (acido folico, vitamine B12 e B6), per le caratteristiche legate al suo metabolismo. Questi cofattori vitaminici sono fondamentali per garantire normali livelli plasmatici di Hcy; per la vitamina B6, inoltre, si sta sempre più affermando l'ipotesi che, una sua carenza, oltre a concorrere all'aumento di Hcy, possa di per sé rappresentare un ulteriore fattore di rischio cardiovascolare, indipendentemente dai valori di Hcy. Per queste sue caratteristiche abbiamo stabilito gli intervalli di riferimento della vitamina B6 in una popolazione di volontari sani viventi a Roma.

Pazienti e Metodi. La vitamina B6 e l'Hcy sono stati dosati su 300 volontari (189 uomini e 111 donne) di età compresa tra i 18 e i 60 anni (media: 35 anni) residenti a Roma. Il sangue raccolto dopo un digiuno di almeno 8 ore e raccolto in provette contenente EDTA, in ghiaccio e al riparo dalla luce l'Hcy è stata misurata tramite HPLC con rivelazione in fluorescenza in accordo al metodo di Araki e Sako; per la vitamina B6, misurata sempre in HPLC, è stato utilizzato un Kit commerciale (Immundiagnostik, Germania). Le differenze tra i vari gruppi sono state analizzate usando un t-test non parametrico (Mann-Whitney U-test).

Risultati.

Vitamina B6 (ng/mL)	Uomini (189)	Donne (111)
Mediana	7.75	5.9
Intervalli	2.0-38.0	1.6-26.1
Hcy (µmol/l)	Maschi (189)	Donne (111)
Mediana	9.1	7.2
Intervalli	4.6-16.6	3.4 - 17.0

I nostri risultati mostrano differenze significative, sia per l'Hcy che per la vitamina B6 legate al sesso ($p=0.002$ and $p=0.003$ rispettivamente). Per la vitamina B6 inoltre, i livelli plasmatici appaiono sensibilmente diversi nei due gruppi di età ($<$ e $>$ di 35 anni) ($p=0.02$) **Conclusioni.** I nostri risultati confermano gli intervalli di riferimento abitualmente usati per Hcy (5-15 µmol/L) e vitamina B6 (5-30 ng/mL); per la vitamina B6, inoltre, potrebbe tornare utile prendere in considerazione anche l'età e il sesso dei pazienti nell'analisi dei risultati ottenuti.

260

CALCEMIA ED ALBUMINEMIA: DUE VALORI INTERDIPENDENTI. STUDIO DI UNA POPOLAZIONE OSPEDALIERA

Antonacci M., *Carnevale V., Checchia de Ambrosio C., Lauriola G., *Varriale A., Santini S.A.
U.O. Laboratorio di Anali Cliniche e *U.O. di Medicina Generale – IRCCS “Casa Sollievo della Sofferenza” – San Giovanni Rotondo – Italy

Premessa ed obiettivi – Una ipercalcemia può suggerire conclusioni diagnostiche e prognostiche di non trascurabile significato. Circa il 45% del calcio (CA) è legato all'albumina (ALB): tale quota è funzionalmente inattiva. In assenza della misurazione diretta del CA ionizzato (CA^{++}) si applica la formula: $4 - (ALB \times 8) + CA$. Si vuole individuare la metodologia più appropriata per determinare l'albuminemia..

Metodologia – In 170 pazienti consecutivi è stata determinata l'ALB sia direttamente (met. Colorimetrico) sia indirettamente (met. Elettroforetico) e quindi ricavate le 170 coppie di valori di CA “corretto”. La prevalenza della ipercalcemia è stata valutata con tre diversi cut-off: $>10,2$, $>10,4$ e $>11,0$ mg/dl. Per il raffronto è stato impiegato il test X^2 : il limite di significatività è stato posto a $p<0,05$.

Risultati – Con i primi due valori di cut-off ($>10,2$ e $>10,4$ mg/dl) la prevalenza dell'ipercalcemia è stata meglio evidenziata utilizzando i valori di ALB misurati direttamente. In particolare sono stati individuati tre casi di iperparatiroidismo primario, mentre in altri pazienti l'ipercalcemia era associata a patologie neoplastiche.

Conclusioni – Non sono rari i casi (soprattutto nelle patologie neoplastiche) in cui un CA totale normale si associa ad ALB bassa: in tali congiunture, la ipercalcemia viene messa in evidenza correlando il CA totale con l'ALB misurata direttamente con metodo colorimetrico. Tuttavia il *gold standard* resta, ove possibile, la determinazione diretta del CA^{++} .

ref. bibliografico: Carroll MF, Schade DS. *A practical approach to hypercalcemia*. Am Fam Physician 2003; 67: 1959-1966

261

DIETE IPOCALORICHE A NORMALE ED ALTA QUOTA PROTEICA NELL'OBESITÀ: EFFETTO SUGLI AMINOACIDI RAMIFICATI E SUL RAPPORTO TRIPTOFANO/AMINOACIDI NEUTRI

Mele M.C.,* Sgadari A.**, Sacco E.*, Castorina M.*, Zuppi C.*, Giardina B.*.

*Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, **Dipartimento di Scienze Gerontologiche, Geriatriche e Fisiatriche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo F. Vito 1, 00168 Roma.

Recenti dati della letteratura¹ indicano che un aumento della quota proteica della dieta, rispetto agli attuali livelli raccomandati ($0,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), possa migliorare la sensazione di sazietà e modificare positivamente il rapporto massa magra/massa grassa nelle dieterapie per l'obesità. Gli aminoacidi ramificati (valina, isoleucina e leucina) supportano differenti processi metabolici che vanno dalla sintesi proteica, alla produzione di energia nel muscolo, alla sintesi di alanina e glutammina (substrati gluconeogenetici nel fegato), alla modulazione della sintesi proteica attraverso sistemi di segnale comuni a quelli insulinici. Il rapporto tra la concentrazione plasmatica di triptofano e quella degli aminoacidi neutri (valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina e metionina), che competono con il primo per l'ingresso nel Sistema Nervoso, influenza direttamente la sintesi della serotonina. Per valutare eventuali differenze nei valori plasmatici di questi aminoacidi, è stato condotto uno studio su 24 pazienti obese (Indice di Massa Corporea $33,7 \pm 3,57$), randomizzate in due gruppi per età, peso e percentuale di massa grassa, ed assegnate a due regimi dietetici con lo stesso decremento energetico rispetto al fabbisogno giornaliero stimato (-500 Kcal), ma con differente ripartizione della quota calorica in termini di glucidi, proteine e lipidi (Proteine Standard (PS) 55%, 15%, 30% e Proteine Elevate (PE) 40%, 30%, 30%). All'ingresso e dopo 8 settimane di dieta sono state misurate le concentrazioni plasmatiche degli aminoacidi e nelle diete PS gli aminoacidi ramificati sono risultati significativamente più bassi rispetto a quelli delle diete PE ($354 \pm 101,4 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ vs $496 \pm 208,0 \text{ } \mu\text{Mol/L}$, $p=0,044$), con una riduzione significativa della leucina nelle diete PS ($134 \pm 24,33 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ vs $119 \pm 19,41 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ $p=0,040$) ed un aumento significativo della valina in quelle PE ($216 \pm 35,79 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ vs $326 \pm 189,83 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ $p=0,039$), mentre il rapporto triptofano/AA neutri aumentava significativamente nelle diete PS rispetto a quelle PE ($43,7 \pm 8,9$ vs $32,2 \pm 12,7$, $p=0,017$). Questi dati preliminari supportano l'ipotesi che, nel trattamento dell'obesità, diete isocaloriche ed isolipidiche, a differente concentrazione proteica, comportino sostanziali modificazioni del profilo plasmatico degli aminoacidi e quindi delle loro funzioni proteino sintetiche e di regolazione metabolica.

¹ Layman D.K. et al, J. Nutr. 133: 411-17, 2003.

262

POSITIVE ASSOCIATION BETWEEN SERUM VITAMIN K LEVEL AND BONE MINERAL DENSITY

Guglielmini E., Petrigli T., Saia A., Ferraro L., Bono A.* and Ciaccio M.

Chair of Clinical Biochemistry and *Chair of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction: Vitamin K is well known for its role in the synthesis of many blood coagulation factors. Also, vitamin K-dependent proteins are very important for bone and vascular health. Vitamin K is known to influence bone metabolism by facilitating the synthesis of osteocalcin because is required for the γ -carboxylation of specific glutamic acid residues, which in turn, allows a firm binding of calcium ions. The bone mineral density decreases drastically after menopause. Recent studies have been shown that vitamin K influences bone mineral density in osteoporotic people and also actually reduce fracture rates. Many factors influence the individual risk of osteoporosis: genetic predisposition, age, sex, race, general health, exercise, smoking, alcohol abuse, hormone therapy and nutritional factors. In fact, current research is emphasizing the role of nutrition in the development of this disease and has been focused on calcium, magnesium, vitamin D roles and macronutrients such as proteins. In the present study, we investigated the relationship between vitamin K₁ and K₂ levels and bone mineral density in post-menopausal women.

Materials and methods: Serum levels of vitamins K₁ and K₂, osteocalcin and other markers of bone metabolism were measured in 100 post-menopausal women (19 with reduced bone mineral density and 52 with normal bone density). Vitamin K₁ and K₂ levels were measured by HPLC method. The vitamins in plasma were analyzed by reversed-HPLC with UV detection at 250 nm. The mobile phase was methanol and ethanol (85:15, v/v) with 0.1 % triethylamine.

Results: The mean concentration (\pm SE) of vitamin K₁ in the normal bone density group was $0.60 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$, in the reduced bone density group was $0.36 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$. The mean concentration (\pm SE) of vitamin K₂ in the normal one was $1.0 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$, in the reduced one was $0.72 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$. Post-menopausal women with reduced bone mineral density showed lower levels of vitamins K₁ and K₂ than those with normal bone mineral density. **Conclusions:** The present findings suggested that vitamin K level is related to post-menopausal bone mineral loss. An extension of this theory is that Vitamin B₆ is an essential cofactor for the ornithine decarboxylase, which regulates osteoblast glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and thus NADPH concentrations: this is essential for the vitamin K cycle, where its epoxide form is converted to the naphthoquinone form, required for γ -carboxylation of osteocalcin. Thus, probably, the vitamin B₆ status could modulate the effects of vitamin K on bone metabolism.

References: Vermeer C., et al. (2004) Eur J Nutr 43: 325-335.

263**DOSAGGIO SIROLIMUS: MEIA VERSUS HPLC**

Manca M.; Rimini E.; Sale M.; Simula L.F.; *Casu G.; Azzena A.; Bertulu S.; Borto R.; Vargiu P.; Cherchi G.B.

Laboratorio di Analisi, Ospedale Civile SS.ma Annunziata, Sassari. Nurex Bioresearch, Sassari*

Il Sirolimus è un lattone macrociclico ad azione immunosoppressiva, utilizzato per la profilassi del rigetto d'organo nei pazienti sottoposti a trapianto di rene.

Scopo del Lavoro: Comparare la metodica HPLC di riferimento per il dosaggio del Sirolimus con un nuovo metodo immunoenzimatico, al fine di valutarne la precisione, accuratezza e la facilità di esecuzione.

Materiali e Metodi: Sono stati analizzati 70 campioni di sangue intero provenienti da pazienti del Centro Trapianti di Rene di Sassari e Cagliari con due metodiche: HPLC e MEIA. Per il sistema HPLC (HP 1100, Hewlett-Packard) il campione estratto in fase solida (SPE, circa 4 ore di preparazione) con kit fornito dalla ditta Nurex S.r.l., viene iniettato in una colonna analitica a fase inversa (C18), la separazione cromatografica del composto ha una durata di 15 minuti.. Per il dosaggio MEIA (IMX Abbott), il campione viene estratto in circa 30 minuti con un reagente di precipitazione, successivamente centrifugato e sottoposto ad una reazione di inibizione competitiva: il segnale viene misurato dopo 60 minuti ed è inversamente proporzionale alla concentrazione del Sirolimus nel campione .

La precisione del metodo è stata valutata effettuando 16 repliche di tre controlli Low, Medium ed High a concentrazione nota, mentre per saggiare la sensibilità analitica sono state eseguite 10 ripetizioni dei calibratori per 4 giorni consecutivi.

Confronto tra i Metodi: Per valutare la correlazione tra i due sistemi è stata impiegata la regressione di Passing e Bablok ed il coefficiente di correlazione di Pearson, da cui è stata estrapolata la retta y (MEIA) = 1.2 x (HPLC) - 0.8 ed r (Pearson) = 0.94

Risultati:

Sensibilità funzionale		5.9 ng/ml
Sensibilità analitica		0.55 ng/ml
Correlazione fra le metodiche		r = 0.94
Precisione. Low	CV%	7.4
Precisione. Medium	CV%	3.6
Precisione. High	CV%	4.3

Conclusioni: I risultati evidenziano che il metodo MEIA potrebbe essere adottato per l'attività routinaria di laboratorio grazie alla sua semplicità e rapidità di esecuzione, fermo restando che per eventuali risultati dubbi, la metodica HPLC rimane il sistema di riferimento.

Bibliografia: Jorga A., Johnston A. Novel therapies in transplantation. Export Opin Investig Drugs. 2005 Mar. 14(3): 295-304.

264**VALUTAZIONE DI UNO STRUMENTO AUTOMATICO IN PEDIATRIA PER LA DETERMINAZIONE DELLA VES (ROLLER 20)**

Parco S.; Donato M.; Vascotto F.; Rosa P.; Tamaro G. IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy

Lo strumento Roller 20 (Alifax, Padova) è un analizzatore in grado di eseguire batterie di 18 campioni per VES in completa automazione da provetta di emocromo con EDTA 3K.

Abbiamo esaminato 120 bambini (60 maschi e 60 femmine), che afferivano all'ambulatorio prelievi dell' UO di Chirurgia pediatrica del nostro Istituto per analisi di controllo non inerenti a patologie infiammatorie. I piccoli pazienti sono stati divisi in due gruppi: da 0 a 12 aa e da 13 a 18aa., in accordo con linee guida SIBioC A tutti è stata dosata la proteina C reattiva e misurato l'ematocrito, risultati entrambi nella norma. Abbiamo dapprima confrontato la velocità di eritrosedimentazione eseguita con il Roller 20 con la Westergren su 60 campioni pediatrici ottenendo una correlazione $r=0.85$ ($y=0.64 + 4.91$).

Le prove di precisione hanno dato per un campione con VES = 4 ripetuto 20 volte un cv di 15.08 % e per un campione con VES = 70 un cv di 9.11 %.

I valori medi nei quattro gruppi di bambini esaminati sono risultati:

maschi 1-12aa: 5.34 ± 4.59 ; 13-18aa: 4.38 ± 3.57
femmine 1-12aa: 5.65 ± 4.63 ; 13-18aa: 5.20 ± 3.91

In considerazione dei buoni risultati di precisione e accuratezza, i valori descritti possono essere considerati i nostri riferimenti pediatrici.

Bibliografia

de Jonge et al. Erythrocyte Sedimentation Rate by the Test-1 Analyzer. Clin Chem 46, No 6, 2000, 881-2

265**UTILITA' CLINICA DELL'IQ 200 NELLA GESTIONE AUTOMATIZZATA DI VARI FLUIDI BIOLOGICI**

Falliti G., Sorrentino M.C., Ciminnisi T., Sapienza D.
Laboratorio Analisi – Istituto Mediterraneo Trapianti e
Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), Palermo

Introduzione. La semplificazione delle metodiche di Laboratorio, l'automazione sempre più sofisticata e l'utilizzo stressato di materiali e campioni hanno consentito da un lato la maggiore rapidità di esecuzione, senza peraltro diminuire l'attendibilità dei risultati e, dall'altro, la progressiva supersectorializzazione dei vari campi. Questo processo ha interessato anche le metodiche relative allo studio del sedimento urinario, con la lettura dello stesso mediante microscopia digitalizzata. La microscopia digitalizzata rappresenta l'evoluzione più recente dei metodi automatizzati per lo screening e l'esame del sedimento urinario. Scopo di questo lavoro è quello di utilizzare tale tecnologia per analizzare altri fluidi biologici "non urina", creando algoritmi per processi diagnostici adattati a diverse tipologie di campioni. Gli elementi individuati nei fotogrammi digitalizzati dal software vengono individuati, ne vengono tracciati i bordi e definita la grandezza ma non possono essere classificati per mezzo della cosiddetta rete neurale dello strumento. La visualizzazione a video delle immagini digitalizzate di tutti gli elementi figurati del campione dà l'opportunità di un'analisi approfondita.

Metodi. Abbiamo condotto una valutazione della funzionalità del nuovo sistema di microscopia automatizzata (IRIS IQ200 - IL), testando lo strumento anche per svariati fluidi biologici "non urina" per verificare la possibilità di un utilizzo supplementare ed alternativo ai metodi manuali: liquido pleurico, liquido ascitico, liquidi da versamenti vari. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad esame citologico.

Risultati. Tutti i campioni sono stati conservati a temperatura ambiente e processati entro 2 h. Sono stati testati 152 campioni di Liquido ascitico, 35 campioni di Liquido pleurico e 20 campioni di liquidi di varia provenienza. E' stata valutata la cellularità dei campioni con una correlazione superiore all'85% alla conta effettuata sia con il contaglobuli sia con camera di conta a volume definito.

Conclusioni. Seppure l'esame citologico rappresenti il gold standard per l'analisi dei liquidi biologici, utilizzando l'IQ 200 il flusso di lavoro viene reso più agevole, si abbreviano le fasi di preparazione dei campioni e si abbina una corretta interpretazione delle immagini. L'integrazione dei dati della microscopia automatizzata con l'analisi chimico-fisica dei fluidi stessi ci ha consentito di stabilire dei percorsi diagnostici personalizzati per i vari tipi di fluidi. La possibilità di visualizzare la parte corpuscolata dei vari fluidi biologici "non urina" ha consentito, inoltre, una migliore e documentata formazione del Personale oltre che il successivo approfondimento diagnostico.

Bibliografia. 1) Deindorfer F., et al., Clin.Chem. 28,1910,1982.

266**OTTIMIZZAZIONE ED AUTOMATIZZAZIONE DEL DOSAGGIO DELL'OSSIDO NITRICO NELLA PRATICA CLINICA DI LABORATORIO**

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

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

Un ruolo chiave dell'NO quale messaggero intra/inter cellulare è stato dimostrato in un rilevante numero di processi biologici quali la regolazione della pressione arteriosa, la modulazione della risposta immune e fenomeni di stress ossidativo di differente origine. Di conseguenza, la determinazione della concentrazione dei nitriti e nitrati è di interesse sempre maggiore nella pratica di chimica clinica quale marcatore dell'attività della NO-sintasi e della produzione dei radicali dell'ossido nitrico. Il metodo di dosaggio più comunemente applicato nei kit diagnostici si basa sulla lettura spettrofotometrica del prodotto della reazione di Griess. A causa delle importanti interferenze derivanti dalla precipitazione delle proteine presenti nel campione è necessaria una deproteinizzazione degli stessi. Sono stati confrontati differenti metodi di deproteinizzazione del siero (precipitazione con zinco solfato, acetone-trile-cloroformio, filtrazione) sulla base della sensibilità, riproducibilità, rapidità, costi e facilità di applicazione nella pratica di laboratorio evidenziandone le potenzialità e limiti di utilizzo. L'aggiunta dei reagenti di Griess, le successive fasi di lettura spettrofotometrica ($\lambda = 550 \text{ nm}$) e di controllo dei fenomeni di interferenza ottica dovuta al materiale biologico in esame sono stati automatizzati su Grifols Triturus. Tale procedura ha consentito di conservare i livelli di specificità e linearità dei kit manuali in commercio, minimizzare le operazioni manuali riducendo l'errore dovuto all'operatore e introdurre un controllo di qualità semi-automatico dell'assenza di fenomeni di precipitazione nei campioni.

Moshage H., Kok B., Huizenga J.R. and Jansen P.L.M. "Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation" *Clin. Chem.* (1995) 41(6 Pt 1): 892-6

267

RICERCA DI IgG OLIGOCLONALI NEL LIQUOR MEDIANTE ISOELETTROFOCALIZZAZIONE CON METODO SEMIAUTOMATICO

Villa C.¹, Bosisio R.¹, Cattozzo G.²¹A.O. S. Antonio Abate, Gallarate²A.O. Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

Nelle malattie neuroimmunologiche del sistema nervoso centrale (SNC) si osserva nel liquor la presenza di IgG oligoclonali, non rilevabili nel siero. L'immunoisoelettrofoocalizzazione è l'esame di elezione per la ricerca di IgG oligoclonali nel liquor. Il procedimento analitico prevede una fase separativa (isoelettrofoocalizzazione su gel di poliacrilammide) ed il trasferimento (blotting) delle IgG risolte in bande oligoclonali su un supporto idoneo per la rilevazione mediante immunofissazione: esso presenta difficoltà di standardizzazione, è laborioso e non è automatizzabile. Recentemente è stato proposto un metodo semiautomatico per l'immunoisoelettrofoocalizzazione delle IgG del liquor, che prevede l'impiego di un particolare gel di agarosio, idoneo all'impiego come supporto per l'isoelettrofoocalizzazione e per l'immunofissazione. In questo lavoro abbiamo valutato alcune caratteristiche di tale metodo. Esso prevede l'isoelettrofoocalizzazione delle IgG su gel di agarosio con anfoline (pH 4,0 – 10,0) e la successiva immunofissazione con anticorpi anti-IgG coniugati con perossidasi. Tutte le operazioni vengono eseguite sullo strumento Hydrasys, utilizzando i reagenti Hydragel CSF isofocusing (Sebia). Il limite di rilevazione delle bande oligoclonali, valutato mediante analisi di campioni preparati per ag-giunta di un siero contenente una componente mono-clonale IgG ad un campione di liquor privo di bande oligoclonali, è risultato pari a 16 mg/L. I tracciati prodotti con il metodo candidato erano caratterizzati da bande oligoclonali di maggiore spessore, riconoscibili più facilmente di quelle evidenziate con il metodo su gel di poliacrilammide. In un esperimento di confronto con il metodo di isoelettrofoocalizzazione su gel di poliacrilammide si è utilizzata una metodica che prevede la de-posizione del campione in posizione anodica (pH più acido): i risultati ottenuti erano conformi a quelli forniti dal metodo di confronto in 28 casi su 32 (15 casi su 17 di malattie demielinizzanti, 3 casi su 4 di polineuropatie, 4 casi su 5 di malattie infiammatorie del SNC e 6 casi su 6 di malattie non infiammatorie del SNC). In un ulteriore esperimento si è utilizzata una metodica che prevede la deposizione del campione in posizione catodica (pH alcalino) e l'applicazione della differenza di potenziale per 6 minuti anche prima della deposizione del campione: si è osservata identità di risultati con il metodo di confronto per tutti i campioni analizzati (6 casi di malattie demielinizzanti e 2 di polineuropatie). Il metodo valutato ha dimostrato soddisfacenti caratteristiche di praticabilità: alcune operazioni sono eseguite automaticamente dallo strumento, mentre gli interventi manuali sono guidati da chiare indicazioni. In 2 ore e 30 minuti è possibile analizzare i campioni (liquor e siero) di 9 pazienti.

268

METODO MODIFICATO PER CATECOLAMINE PLASMATICHE IN HPLC. APPLICAZIONE SU STRUMENTAZIONE PREESISTENTE.

M. Rastelli, L. Santori

Laboratorio Analisi Cliniche – Ospedale Guglielmo da Saliceto – Piacenza

La determinazione delle catecolamine plasmatiche in HPLC è ancora un esame di chimica clinica tra i più impegnativi per l'operatore. Obiettivo del nostro studio è la valutazione di un metodo commercializzato dalla ditta Chromsystems (che fornisce anche calibratori e controlli) utilizzando una strumentazione Biorad già in uso nel nostro Laboratorio.

Materiali e metodo. Rispetto al metodo classico sono da notare due differenze: 1) le catecolamine vengono adsorbite e purificate su allumina impaccata in colonnine, e questo accorgimento semplifica la manualità; 2) la separazione cromatografica avviene su colonna C18, invece che a scambio ionico.

La strumentazione da noi usata comprende: pompa a due pistoni mod. 1350 soft start, degasatore ERC-3001, detector elettrochimico 1640, autocampionatore AS-100 HRLC, integratore HP 3394° Hewlett-Packard.

I campioni di plasma vengono conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. La separazione cromatografica avviene a temperatura ambiente.

Risultati. Sono state effettuate le usuali prove secondo NCCLS. I risultati ottenuti sono qui schematizzati.

Imprecisione intraserie.

	ng/ml	C.V.%	ng/ml	C.V.%
Noradrenalina	203	5.9	1538	3.2
adrenalina	68	4.4	306	5.5
Dopamina	157	4.4	555	6.8

Imprecisione interserie.

	ng/ml	C.V.%	ng/ml	C.V.%
Noradrenalina	203	5.9	1538	6.4

Noradrenalina	25 ng/ml
Adrenalina	20 ng/ml
Dopamina	15 ng/ml

Adrenalina	68	6.5	306	9.4
Dopamina	157	12.7	555	5.1

Recupero

Noradrenalina	88%
Adrenalina	81%
Dopamina	91%

Limite di rivelabilità

Non è stata rilevata interferenza da propranololo o suoi metaboliti.

Le analisi eseguite su plasma ottenuto con LiEparina e con EDTA hanno dato risultati sovrapponibili.

Conclusioni. La valutazione del kit esaminato ha dato esiti soddisfacenti sia per i risultati analitici sia per la facilità di utilizzo.

269

VALUTAZIONE ANALITICA DI UN NUOVO METODO DI DOSAGGIO PER IL SIROLIMUS (ABBOTT-IMX) E COMPARAZIONE CON HPLC

Di Serio F., Ruggieri V., Pansini N.
U.O. Patologia Clinica I, Policlinico Bari, piazza G. Cesare 11, 70100 Bari

Scopo. Il Sirolimus (Rapamicina) è un efficace immunosoppressore utilizzato per prevenire il rigetto d'organo in pazienti sottoposti a trapianto di rene. Usualmente il monitoraggio farmacologico è eseguito in HPLC, tecnica di non facile utilizzo e non sempre disponibile nei vari centri. In questo studio è stata valutata la performance analitica e preanalitica di un nuovo sistema semiautomatico di dosaggio del Sirolimus, il metodo Abbott-IMX; i risultati sono stati comparati con quelli ottenuti in HPLC. **Metodo.** Il dosaggio IMx Sirolimus è un metodo immunoenzimatico a cattura di microparticelle (MEIA). Precisione, sensibilità funzionale e linearità del metodo sono state valutate in accordo con le linee guida NCCL EP5-A ed EP6-A. L'effetto di sostanze endogene sull'accuratezza dei risultati è stato determinato in 2 pools di sangue con una concentrazione di Sirolimus di 6 e 8 ng/ml a cui erano aggiunti bilirubina non coniugata (20 mg/dl) e trigliceridi (3000 mg/dL): le concentrazioni di Sirolimus ottenute erano confrontate con quelle dei rispettivi pools di controllo (NCCL EP7-A). Il metodo Abbott è stato comparato (NCCL EP-9A) con il metodo di riferimento: 50 campioni raccolti da pazienti sottoposti a trapianto di rene, erano testati su IMX (media \pm SD = 9.6 ± 6.3) e HPLC/MS (media \pm SD = 8.4 ± 4.9). **Risultati.** *Studio di precisione* (4 determinazioni per 20 consecutivi giorni): controllo 1 (media 5.4 ng/ml), CV totale = 3.8%; controllo 2 (media 11.3 ng/ml), CV totale = 3.6%; pool (media 14 ng/ml), CV totale = 3.9%. *Sensibilità analitica:* il limite di misura del metodo, calcolato come il valore medio più 3 SD di 20 replicati del calibratore zero) era 0.8 ng/ml. *Sensibilità funzionale:* le più basse concentrazioni che in un profilo di imprecisione mostravano un CV = 10 e 20% erano 2.6 e 1.5 ng/ml rispettivamente. *Linearità:* il test era lineare ($y = 0.98 (\pm 0.017)x + 1.37 (\pm 0.32)$; $r^2 = 0.99$) per concentrazioni da 0 a 30 ng/ml; $F = 2.19$; $p = 0.13$. *Sostanze interferenti:* nessun significativo effetto interferente ($p > 0.05$) sulle concentrazioni del Sirolimus era evidenziato nei due pools di sangue in seguito all'aggiunta di bilirubina e/o trigliceridi. *Comparazione tra metodi:* la comparazione tra metodi è stata valutata con la regressione Deming: $y = 1.2504 (\pm 0.12)x - 1.2638 (\pm 1.1)$; $Sy/x = 2.7$; $r = 0.83$. L'analisi di Bland - Altman evidenziava una differenza media tra i due metodi non statisticamente significativa: bias = 0.8 (95% IC: -0.1 a 1.8) ng/ml. **Conclusioni.** Le caratteristiche analitiche e la semplicità di utilizzo, rendono il metodo MEIA Abbott-IMX particolarmente utile nella pratica clinica per il monitoraggio del Sirolimus in pazienti sottoposti a trapianto di rene.

270

VALUTAZIONE DELLA DETERMINAZIONE DI SCC IN CHEMILUMINESCENZA SU SISTEMA ARCHITECT.

Chieragatti I.¹, Sandri M.T.², Cassiano L.¹, Passerini R.², Dolci A.¹.

¹Dipartimento di Patologia H MultiMedica, via Fantoli 16/15, 20138 Milano; ²U.O. Medicina di Laboratorio, Istituto Europeo di Oncologia, via Ripamonti 435, 20141 Milano

Razionale: l'antigene associato al carcinoma squamocellulare (SCC) è una glicoproteina di 48 kD, descritta per la prima volta nel 1977, le cui attività biologiche sono finalizzate alla crescita ed all'espansione tumorale. SCC è utilizzata come marcatore tumorale nel follow-up del carcinoma squamocellulare della cervice, dell'esofago, del polmone e della testa e del collo per la diagnosi precoce delle recidive ed il monitoraggio della terapia radiante o farmacologica.

Scopo del lavoro: Abbiamo valutato il dosaggio in chemiluminescenza a due step sviluppato sul sistema Architect per la determinazione dell'SCC su siero o plasma.

Metodologia: nei due laboratori della valutazione è stato applicato il protocollo NCCLS EP10-A abbreviato a 5 giorni sul sistema Architect (Abbott Diagnostics Italia, Roma) che utilizza, in completa automazione, la tecnologia della chemiluminescenza a cattura di microparticelle. L'immunodosaggio a due step impiega 2 differenti anticorpi monoclonali (MAb) anti-SCC, il primo di cattura legato alle particelle magnetiche come fase solida ed il secondo di rilevazione marcato con acridinio. Il range dinamico del kit Architect SCC è pari a 0.1 - 70 μ g/L ed il sistema offre una cadenza analitica di 200 test/ora teorici. Per il test di correlazione è stato utilizzato come sistema di riferimento lo strumento IMx (Abbott Diagnostics Italia, Roma).

Risultati: l'imprecisione totale eseguita sui controlli basso (2.0 ± 0.1 μ g/L), medio (10.3 ± 0.3 μ g/L) e alto (49.4 ± 1.8 μ g/L) mostra un CV% rispettivamente di 4.9, 2.7 e 3.7, mentre la sensibilità analitica si attesta a < 0.05 μ g/L. Il test di correlazione con il sistema IMx, eseguito su 100 campioni (range 0.1-67.9 μ g/L), mostra un coefficiente di correlazione secondo Pearson di 0.997, con una pendenza di 1.43 e un'intercetta di 0.11, includendo tra i dati anche un evidente outlier misurato 4.7 μ g/L su IMx ed 1.0 μ g/L su Architect.

Conclusione: il dosaggio di SCC sull'analizzatore automatizzato per chemiluminescenza Architect mostra un'elevata sensibilità analitica, una bassa imprecisione ed in termini di accuratezza, un elevato grado di associazione con il sistema di riferimento adottato ma con una sovrastima sistematica proporzionale dei risultati. Pertanto si può ritenere un solido metodo automatizzato per la determinazione routinaria di SCC in totale automazione

Bibliografia: Sumitani Y. Et al. Biological role of SCC Antigen Tumor. Biology 1998; 19:505-16

271

VALUTAZIONE DEL DISPOSITIVO POCT ACCU-CHEK INFORM (ROCHE) PER LA DETERMINAZIONE DELLA GLICEMIA

Antenucci M., Forni F., Minucci A., Persichilli S., Corsale P., Mordente A., Zuppi C.
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica - UCSC Roma

Il monitoraggio rapido ed accurato della glicemia è essenziale per il trattamento del paziente critico e per la gestione dei pazienti diabetici. Il Point of Care Testing (POCT) ha spesso il limite di fornire risultati non memorizzati informaticamente nella banca dati e di non essere supportato da un QC adeguato, se non gestito dal laboratorio. La principale caratteristica del glucometer Accu-Chek Inform Roche è proprio quella di poter essere interfacciato al sistema gestionale del Laboratorio, permettendo in tal modo ai suoi operatori di intervenire sulla gestione del controllo di qualità e su quella dei risultati raccolti al letto del paziente. Scopo del lavoro è la valutazione della performance del dispositivo Accu-Chek Inform Roche, che determina la glicemia con tecnica elettrochimica (elettrodi al palladio, reazione enzimatica glucosio-DH), utilizzando come strumento di riferimento l'analizzatore Olympus AU 2700 (reattivo Olympus UV enzimatico, metodo esochinasi). **Metodi.** E' stata misurata la glicemia su 200 pazienti afferenti al reparto di Endocrinologia del nostro Policlinico utilizzando il sistema Accu-chek: i risultati sono stati "scaricati" dal reparto nel sistema informatico dell'ospedale e confrontati con le glicemie degli stessi pazienti, misurate contemporaneamente su aliquote litio-eparinate processate su analizzatore Olympus AU 2700. Il tempo intercorso tra le due differenti determinazioni è stato inferiore a 60 minuti. La precisione inter-serie è stata valutata ripetendo la misura dei controlli Accu-Chek (2 livelli), forniti dalla casa produttrice, per un mese. La precisione intra-serie è stata valutata ripetendo la misura dei 2 controlli per 10 volte in una stessa giornata. **Risultati.** L'analisi di regressione lineare (Passing.Bablok) mostra che il glucometer Accu-Chek Roche ha un'ottima correlazione con l'analizzatore Olympus in tutto il range dei valori studiati (40 - 500 mg/dl, $R^2 = 0,99$). I coefficienti di variazione (CV%) inter-serie sono stati 1,7% e 2,6% rispettivamente per il controllo alto e per il controllo basso, mentre i CV% intra-serie sono stati 2,5% per il controllo alto e 1,9% per il controllo basso (CV% dell'analizzatore Olympus relativo al periodo di misura: 2,45% per il controllo basso e 3,2% per il controllo elevato). **Conclusioni.** Il glucometer Accu-chek Inform da noi testato ha ottenuto un'ottima performance analitica e clinica in un ampio range di valori di glicemia, risultando preciso anche per valori estremi. Accanto ad una estrema maneggevolezza che ne facilita l'utilizzo come POCT, la possibilità di gestione del controllo di qualità da parte del Laboratorio e l'immissione in rete dei risultati ottenuti garantisce e consolida le operazioni svolte al letto dei pazienti.

272

VALUTAZIONE DEL NEFELOMETRO DELTA (RADIM) PER IL DOSAGGIO DI PROTEINE SPECIFICHE

Bassi L., Comelini L., Rizzardi S.
Azienda Istituti Ospitalieri, Laboratorio analisi
Viale Concordia 1 - 26100 Cremona

Scopo: Scopo del lavoro era valutare le prestazioni analitiche del nefelometro DELTA (RADIM) per la gestione dei dosaggi di alcune proteine specifiche. Questi tests, in precedenza dosati presso il nostro laboratorio, sono al momento eseguiti, con tecnica turbidimetrica, da un altro laboratorio aziendale posto a 40 Km. La valutazione dello strumento trova la sua finalità nella possibilità di reinserire un nefelometro in laboratorio per riprendere la gestione di queste piccole serie di esami, dato il numero limitato di richieste, o esami particolari. Questo consentirebbe di fornire risposte più rapide a quesiti clinici posti dai medici di reparto o di completare le informazioni di altri esami (dosaggio di proteine specifiche del tracciato elettroforetico).

Materiali e metodi: Sono stati valutati i tests; TAS, HPT, PREALB, K, LAMBDA, IGM, IGG e RF.

I campioni di siero della routine sono stati dosati in nefelometria su DELTA e i risultati confrontati con i valori refertati dopo dosaggio turbidimetrico.

Le correlazioni calcolate sono risultate vicine al valore di uno. Il risultato conferma che le due metodologie analitiche utilizzano, per molte proteine, la standardizzazione con il medesimo standard internazionale CRM 470.

Test	Correlazione	Test	Correlazione
TAS	0.974	K	0.997
HPT	0.963	LAMBDA	0.988
PRE	0.957	IGG	0.994
IGM	0.984		

Si sono osservati dei problemi su RF: infatti non è stato possibile calcolare la correlazione, i risultati analitici non erano confrontabili e spesso un dato patologico con un metodo non lo era con l'altro. Non è stato possibile verificare quale dato fosse clinicamente valido, non essendo nota la storia clinica dei pazienti (esterni di routine). Il test, inoltre, sarà in seguito gestito dal settore di microbiologia nel panel di esami per l'autoimmunità con strumentazione diversa. La precisione nella serie, eseguita con IGM, ha dato un valore di CV % di 2.13.

Conclusioni: Il nefelometro DELTA si è dimostrato uno strumento di facile apprendimento, di semplice utilizzo, con ridotto impegno di personale. La possibilità di visualizzare le calibrazioni eseguite, a 6 punti, è di grande utilità per una migliore valutazione della affidabilità analitica dello strumento. Inoltre, lo strumento può essere inserito in una routine ristretta di esami che non sarebbe opportuno caricare su strumentazioni di grossa o media routine.

273

VALUTAZIONE DI UN NUOVO METODO IN HPLC PER IL DOSAGGIO DELLA TRANSFERRINA DESIALATA (% CDT)

Folli D., Granata S., Marocchi A.
Laboratorio di Biochimica Clinica A. O. Niguarda
P.zza Ospedale Maggiore 3, 20162 MILANO

Il dosaggio della transferrina desialata è un marcatore di abuso alcolico di uso comune con valenze medico-legali. Esistono diversi metodi per la determinazione di questo analita. **Scopo** del nostro lavoro è la valutazione del nuovo metodo “%CDT by HPLC” (BIO-RAD Laboratories GmbH, München) con strumentazione HPLC AGILENT 1100.

Materiali e metodi. Si è valutata l'imprecisione nella serie; per l'imprecisione tra serie abbiamo valutato i controlli (due livelli) forniti dalla ditta BIO-RAD eseguiti in ogni seduta in un periodo di 5 mesi. I valori teorici dei controlli sono rispettivamente: 1.15% (0.85 – 1.45) e 4.80% (4.35 – 5.25). Abbiamo eseguito il confronto con il metodo “N Latex CDT” (DADE-BEHRING Marburg GmbH, Marburg) su nefelometro BNII valutando il significato clinico del dato. Infine si sono determinati i valori di CDT% in un gruppo selezionato di soggetti apparentemente sani che si erano astenuti dall'assunzione di alcool per almeno 30 giorni.

Risultati. Per l'imprecisione nella serie si sono ottenuti i seguenti CV % per ogni isoforma di transferrina su 13 replicati:

DST media 0.9% ; CV 7.9% ;
TRIST media 4.4% ; CV 1.5% ;
TEST media 81.1% ; CV 0.3% ;
PEST media 13.5% ; CV 0.9% ;

Per l'imprecisione tra serie abbiamo ottenuto i seguenti risultati su 15 replicati:

Controllo 1 (valore teorico DST = 1.1%):

DST media 0.9% ; CV 13.7%
TRIST media 3.6% ; CV 5.7%
TEST media 81.9% ; CV 0.5%
PEST media 13.4% ; CV 2.0%

Controllo 2 (valore teorico DST = 4.80):

DST media 4.5% ; CV 5.0%
TRIST media 3.8% ; CV 4.7%
TEST media 77.7% ; CV 0.6%
PEST media 14% ; CV 2.4%

Nei soggetti con dieta priva di alcool il valore di CDT si è attestato al disotto dell'1.1%.

Conclusioni. Il metodo preso in esame si è rivelato preciso sia nella serie che tra serie. Nei soggetti che si sono astenuti da assunzione di alcool per un mese il valore di CDT si attesta ben al disotto del valore soglia suggerito dal metodo. Ulteriori studi sono in corso nel nostro laboratorio per valutare un'eventuale associazione del valore di CDT con altri indici di funzionalità epatica quali γ GT, AST, ALT, Bilirubina e MCV.

Bibliografia. “Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation” Torsten Arndt

Clin. Chem., Jan 2001; 47: 13 - 27

274

LA CITOFUORIMETRIA NELLA DIAGNOSI DELL'ALLERGIA AI BETALATTAMICI: LA NOSTRA ESPERIENZA

Brusca I., Gristina T., Polizzi G., Barrale M., Cantisano V., Li Vigni P., La Chiusa S.M.
U.O. Patologia Clinica , Ospedale “Buccheri la Ferla”
F.B.F. Palermo

Introduzione. La diagnosi “in vitro” dell' allergia a farmaci presenta ancora oggi molte difficoltà ed incertezze. Il dosaggio delle IgE specifiche è disponibile e scientificamente validato solo per pochi farmaci ed è comunque gravato da una sensibilità non elevata. Recentemente (1) sono stati proposti metodi che utilizzano, ai fini diagnostici, marcatori di attivazione dei basofili, evidenziabili in citofluorimetria dopo incubazione delle cellule in vitro con il farmaco. Nel nostro studio abbiamo analizzato i risultati del I° anno di utilizzo di questa metodica nella diagnosi dell' allergia ai betalattamici (BLAT).

Materiali e metodi. Sono stati inclusi nello studio 37 pazienti consecutivi. 18 di questi avevano presentato sindrome orticaria-angioedema (SOA) ed un paziente shock anafilattico in seguito alla somministrazione di BLAT, (gruppo A: diagnosi clinica certa); 11 pazienti avevano presentato SOA in seguito a somministrazioni di FANS e BLAT (gruppo B, attualmente ancora senza diagnosi clinica); 8 avevano anamnesi negativa nei confronti dei BLAT ed avevano assunto saltuariamente farmaci di questa classe (gruppo C, controlli sani). L'attivazione dei basofili è stata valutata in citofluorimetria utilizzando come marker il CD63. Gli allergeni testati sono stati: Penicillina G e V, PPL, MDM, Amoxicillina, Ampicillina, Cefalosporina C e Cefuroxime. Reagenti e farmaci sono disponibili in commercio (Flow Cast, Allergen Cast; Bühlmann, Basel, CH). Sono stati considerati positivi gli allergeni con una attivazione dei basofili almeno doppia rispetto al controllo negativo del paziente. Sono state dosate inoltre le IgE specifiche per Penicillina G e V, Amoxicillina ed Ampicillina (DPC, Immulite 2000).

Risultati. 16/18 pazienti del gruppo A hanno presentato almeno uno degli allergeni testati positivo (88,89 %, 95% C.I. 82,73-95,05); nello stesso gruppo le IgE specifiche sono risultate presenti in 7/18 pazienti (38,89%, 95% C.I. 29,33-48,44). Nessuno dei pazienti del gruppo C è risultato positivo con entrambi i metodi. La specificità del Flow Cast e delle IgE specifiche è stata quindi del 100%. Nel gruppo B 2 pazienti sono risultati totalmente negativi; 3 sono risultati positivi ad almeno uno degli allergeni BLAT e negativi ai FANS testati; 6 positivi ad entrambe le classi di farmaci di cui 2 a tutti gli allergeni testati. Le IgE specifiche in questo gruppo sono state sempre negative.

Discussione. I risultati ottenuti evidenziano, nella diagnosi di allergia ai BLAT, le prestazioni superiori del Flow Cast rispetto alle IgE specifiche. I dati del gruppo B suggeriscono che il test potrebbe essere positivo anche nelle reazioni non IgE mediate, rendendo necessario, in questi casi, una valutazione clinica dei risultati.

(1) Ebo et al. Clin Exp Allergy 2004; 34:332–339

275

DETERMINAZIONE DELLA CICLOSPORINA EMATICA SU AU400 OLYMPUS

Cangiano G.¹, Russo M.¹, Forte F.¹, Di Maina E.¹, Latte A.¹, Sessa A.³, D'Amora M.², Risitano A.¹
 ASL NA 1: ¹Laborat. Patologia Clinica P.O. Pellegrini;
²Laborat. Patologia Clinica P.O. Incurabili; ³U.O. Nefrologia - DH Trapiantati P.O. Pellegrini;

La valutazione del dosaggio ematico della ciclosporina, effettuato assieme ad altri parametri biochimici, e principalmente le indicazioni cliniche consentono di effettuare una pronta terapia immunosoppressiva riducendo così gli effetti collaterali in pazienti sottoposti a trapianto di rene.

La collaborazione pluriennale con il DH Trapiantati dell'U.O. di Nefrologia del P.O. dei Pellegrini ha messo in evidenza dei dosaggi di ciclosporina, effettuati al tempo zero, contenuti nel range 40 – 250 ng/mL; concentrazioni generalmente non superiori ai 1000 ng/mL si sono invece riscontrate per determinazioni effettuate alla seconda ora.

Col presente lavoro si propone una modifica all'immunodosaggio enzimatico omogeneo CEDIA, effettuato sull'analizzatore di chimica clinica AU 400 della ditta Olympus, al fine di determinare concentrazioni di farmaco fino a 1000 ng/mL usando contemporaneamente sia i livelli bassi che alti di ciclosporina ed evitando così il passaggio da una metodica all'altra effettuabile solamente a strumentazione ferma.

Il dosaggio della ciclosporina al tempo zero e dopo due ore viene effettuato con un'unica calibrazione a 4 punti (spline – 4AB), partendo da un punto zero (albumina bovina), ed utilizzando solamente la confezione di calibratori elevati necessari per costruire le concentrazioni di 994 (diluizione 1:2 con albumina del calibratore di 1988 ng/mL), di 441 ng/mL e di 147 ng/mL (diluizione 1:3 con albumina del calibratore di 441 ng/mL).

A 195 µL di reagente R1 (anticorpi monoclonali murini anti-ciclosporina, tampone MOPS ed accettore enzimatico) vengono miscelati 10 µL di campione (100 µL di sangue anticoagulato con EDTA e 400 µL di reagente lisante. Dopo opportuna incubazione (circa 10 cicli macchina) l'analizzatore biochimico inserirà il reagente R2 (donatore enzimatico coniugato con ciclosporina e tampone MES). 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 100 e 1000 ng/mL di ciclosporina viene evidenziato un profilo di imprecisione mostrante un CV% < 5%. Le prove di recupero mostrano coefficienti di variazione compresi tra 90,1 e 97,6% (recupero medio del 95,9%). Le prove di precisione nella serie e tra le serie, mostrano CV% inferiori al 5%.

Cangiano G., D'Amora M., Latte A. et Al. Dosaggio immunoenzimatico CEDIA della ciclosporina sierica. *Biochimica Clinica*, 2004, vol. 28, n.1: 150.

276

STUDIO DEL CARIOTIPO: CONFRONTO FRA DUE METODI DI ANALISI

Sicà A.*, Concer A.*, Elengikal P.*, Peruzzini A.*
 Schinella M.**,
 *Laboratorio Patologia Clinica Ospedale S. Chiara TN
 **Laboratorio Patologia Clinica Ospedale S. Maria del Carmine Rovereto TN

Per eliminare l'uso di sostanze altamente tossiche si attua il confronto tra due metodi di analisi per lo studio citogenetico del cariotipo umano su sangue periferico. Il metodo tradizionale "con lavaggi" (C.L.) viene confrontato con un nuovo metodo "Syncroset" (S) che utilizza reattivi già pronti all'uso. Il confronto viene operato mediante valutazione su:

1. il numero medio di metafasi;
2. la qualità del bandeggio;
3. tempi di esecuzione;
4. contenuto delle sostanze adoperate

Il confronto ha consentito di constatare che il metodo S presenta una qualità di bandeggio sovrapponibile al metodo C.L. Il numero dei campioni con qualità di bandeggio classificabile come buona è lo stesso per i due differenti procedimenti. I campioni di scarsa qualità sono differenti per i due procedimenti, ma non abbastanza per dimostrare un diverso comportamento dei due metodi. In particolare i dati ottenuti sulla qualità del bandeggio, si riferiscono a 31 campioni analizzati, di cui 16 presentavano la stessa qualità dei preparati cromosomici al 50%.

I risultati ottenuti dimostrano:

- a) che l'impiego del metodo S permette l'eliminazione di sostanze pericolose quali BrdU R: 46, 61, 20/21/22 Timidina, R: 46, 61, Antibiotici R: 22, 42/43 impiegate secondo il protocollo culturale col metodo C.L.
- b) la riduzione dei tempi di analisi con reattivi già pronti all'uso
- c) che la fase di preparazione dei campioni con il metodo S non prevede due step di lavaggi di colture cellulari
- d) la maggiore velocità di lettura al microscopio dei preparati cromosomici, grazie all'aumentato numero di metafasi per campo.
- e) che il numero medio di metafasi per campo nel metodo S risulta superiore rispetto al tradizionale metodo C.L.
- f) che i preparati cromosomici, abbiano un maggior numero di metafasi per campo, ed un indifferente tipo di bandeggio

Si può affermare che nel 50% circa dei casi la scelta di uno o dell'altro metodo culturale è ininfluente sulla qualità del bandeggio, in quanto entrambi danno sullo stesso campione lo stesso risultato. Nel 50% circa dei casi, la probabilità che un metodo dia un bandeggio migliore dell'altro è di nuovo 50%. In definitiva, la qualità del bandeggio con l'impiego dell'uno o dell'altro protocollo culturale è puramente casuale.

Bibliografia: www.sigu.net Linee guida di citogenetica postnatale settembre 2002

277

SCREENING DELLA CISTINURIA (METODO AL FOSFOTUNGSTATO) SU AU600 OLYMPUS E PROPOSTA DI INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Latte A.¹, Cangiano G.¹, Russo M.¹, D'Amora M.², Forte F.¹,
Di Maina E.¹, Terribile M.³, Scognamiglio D.⁴, Risitano A.¹
ASL NA 1: ¹Lab. Pat. Clin. P.O. "Pellegrini"; ²Lab. Pat. Clin. P.O. "Incurabili"; ³Nefrologia P.O. "Pellegrini"; ⁴Centro Screening ipotiroidismo e fenilchetonuria P.O. "Annunziata"

La cistinuria rappresenta la forma più frequente di aminoaciduria congenita (difetto del riassorbimento tubulare) che porta alla precipitazione di cistina e quindi alla formazione di calcoli a livello delle pelvi.

Le numerose e pressanti richieste di dosaggio di cistinuria pervenute dall'Ambulatorio di Nefrologia del P.O. dei Pellegrini, e l'impossibilità di utilizzo del vecchio test di Brand al cianuro, hanno sensibilizzato il Laboratorio verso lo studio di un semplice e rapido dosaggio di screening, completamente automatizzato e capace di quantificare la cistinuria. Il principio del metodo proposto si basa sulla riduzione del gruppo disolfuro della cistina e degli altri disolfuri, da parte del bisolfito. I gruppi sulfidrici formati reagiscono con acido fosfotungstico per dare luogo al blu di tungsteno, letto a 600 nm. Con un bianco campione si bloccano i gruppi sulfidrici formati grazie alla presenza di cloruro mercurico. La determinazione viene effettuata sull'analizzatore Olympus AU600 allestendo due distinte metodiche: una che dosa la totalità dei gruppi sulfidrici (150 µL di reag.1: 5 mL di t. acetato, 1,5 mL di solfito di sodio e 3,5 mL di acqua; 100 µL di reag.2: ac. fosfotungstico 25%) e l'altra (bianco) che determina tutti i gruppi sulfidrici non derivanti dalla cistina (150 µL di reag.1: 5 mL di t. acetato, 1,5 mL di solfito di sodio, 2,5 mL di acqua ed 1 mL di cloruro mercurico; 100 µL reag.2: ac. fosfotungstico 25%). Ambedue le metodiche utilizzano 50 µL di urina. La reazione a termine viene letta dopo 27 cicli macchina. La concentrazione di cistina sarà automaticamente ottenuta per differenza di risultati tra le due metodiche. La variazione di assorbanza ottenuta tra campione e bianco è calcolata usando un urina come calibratore unico, in precedenza testata con standard di cistina di 5 mg/dL. Nell'intervallo analitico 1 - 25 mg/dL di cistinuria si evidenzia un profilo di imprecisione mostrante un CV% < 5%. Le prove di recupero mostrano CV% di 81,2 - 100,4% (recupero medio: 96,6%). Le prove di precisione nella / tra le serie, mostrano un CV% < 3%. L'analisi statistica effettuata su 230 raccolte urinarie delle 24 ore evidenzia un range di riferimento compreso tra 10 e 142 mg/die di cistinuria. Dosaggi giornalieri più elevati sono stati confermati con la cromatografia a scambio ionico ($y = 0,4669.x + 1,1386$; $r^2 = 0,9982$). Quanto sopra rappresenta una mera sperimentazione scientifica. Per l'applicazione clinica ci si riferirà al D.Lgs. n° 332 dell'8/9/2000.

Guerra A. et Al. Cistinuria: description of a simple method of determination and our 5-year clinical experience. Acta Biomed Ateneo Parmense. 1990;61 (1-2):85-90.

278

APPLICATION OF THE EVIDENCE® BIOCHIP ARRAY ANALYZER IN A CLINICAL STUDY OF DRUGS OF ABUSE: AN EVALUATION OF DIAGNOSTIC ACCURACY IN COMPARISON WITH THE DIMENSION ARX

Filocamo M.¹, Arlotti C.¹, Tura M.¹, Licata M.², Ceroni V.¹, FitzGerald S.P.³, Lamont J.³

¹ Drug-Toxicology Section of the UO Laboratory Medicine- Clinic Pathology Dept.- AUSL Rimini, Italy.

² Forensic Toxicology Laboratory, Forensic Medicine, Modena University, Italy.

³ Randox Laboratories Ltd, Diamond Road, Crumlin, Co Antrim, tel: 02894 422413

This study examined the analytical performance of a multi-analyte biochip array analyser Evidence®, testing urine samples in 10 drugs of abuse immunoassays.

Tests for amphetamine class, barbiturates, benzodiazepine class, methadone, opiates, phencyclidine (PCP), benzoylecgonine (BZG), tetrahydrocannabinol (THC) and creatinine were performed on the Evidence® system. The diagnostic accuracy of the Evidence® analyzer was evaluated in terms of intra- and inter-assay precision over a 10-day trial, running both Evidence® and Bio-Rad® controls on the instrument, and a method comparison was carried out between the Evidence® & Dimension instruments over 6 days.

For the 10-day precision trial, intra- and inter-assay CVs at the immunoassay cut-off concentrations ranged between 3.6-12.7% and 5.2-8.4% for the Evidence® & Bio-Rad® controls respectively. Corresponding inter-assay CVs were 4.5-14.8% and 3.7-12.3%. During the method comparison, Bio-Rad® controls on Dimension gave CVs between 2.9-22.9%. In the method comparison, agreement between the systems ranged between 89.5 to 100%. GC/MS or HPLC confirmation was requested for 18 samples, for which the Evidence® and Dimension® results did not agree, or when the levels of analyte measured were close to the assay cut-off value. Of these confirmations, five agreed with the Evidence® determination, two with Dimension, and 11 other discrepancies were due to differences in detection.

Agreement between the Evidence® and Dimension systems in the method comparison was excellent for most tests. Confirmation was requested for a number of samples by GC/MS or HPLC analysis, and these results also showed good agreement with the Evidence® results. This suggests that the use of the Evidence® analyzer could not only improve the throughput of the laboratory, but also shows a higher level of agreement with GC/MS confirmation than the Dimension in the samples confirmed for this study.

279

MICROGEL (INTERLAB) AND CAPILLARYS (SEBIA): COMPARISON OF SERUM PROTEINS ELECTROPHORESIS

*Dessi M., *Agnoli A., *Casciani S., *Luciani V.,
 °Visconti U.
 *Laboratory Medicine, University Hospital "Tor Vergata" Viale Oxford 81, 00133 Rome, Italy.
 °Interlab S.r.l., Via Rina Monti 26, 00155 Rome, Italy

Introduction: The aim of this study was to compare the analytical performances and practicability of two fully automated systems for serum proteins electrophoresis.

Materials and Methods: electrophoresis of 103 fresh serum samples were run on Microgel, a new completely automated system for agarose gel zone electrophoresis (Interlab, Roma) and Capillarys, a system for capillary zone electrophoresis (Sebia Italia, Firenze). The electrophoretic methods used on Microgel and Capillarys allowed the resolution of the beta zone into two distinct bands beta-1 and beta-2. The electrophoretic patterns obtained with the Microgel were inspected visually to identify suspected monoclonal components. Graphs from Capillarys were read to detect abnormal profiles.

The adopted standard protocol included the search for suspected monoclonal components on both Microgel agarose gel electrophoretic patterns and Capillarys densitometric graphs. Immunofixation electrophoresis of detected bands was performed to confirm and characterize their biochemical identity. Results from the visual inspection of Microgel patterns were compared with those of the graphs from Capillarys. Correlation between the densitometric values of the fractions, obtained with both instruments, was also calculated

Results: correlation study gave as follows: albumin $r=0.94$, $\alpha_1 r=0.80$, $\alpha_2 r=0.96$, $\beta_1 r=0.83$, $\beta_2 r=0.89$, $\gamma r=0.98$. Results showed an additional band or an abnormal profile in the gamma zone of 19 samples out of the 103 tested (18,4 %) in both systems. Immunofixation confirmed 13 monoclonal bands. Agreement between the two systems was 98,0 % (101/103).

Discussion: Microgel and Capillarys showed similar diagnostic efficacy. Microgel showed better analytical practicability in terms of number of test per hour: 156 test/h for Microgel and 80 tests/h for Capillarys.

Furthermore, the agarose gel plate obtained with Microgel is a permanent record displaying the actual resolution of the bands for the direct visual inspection of the protein patterns, after the electrophoretic separation thus enabling a more affordable evaluation of the results.

Reference: Blessum C., Jeppsson J.O., Aguzzi F., Bernon H., Bienvenu J.,
 Capillary electrophoresis: principles and practice in clinical laboratory.
 Ann. Biol. Clin. (Paris) 1999; 57: 643-57.

280

VALUTAZIONE ANALITICA DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLA BILIRUBINA NEL SIERO CON ANALIZZATORE AUTOMATICO

Cattozzo G.¹, Nocera L.¹, De Luca G.^{1,2}
¹A.O. Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese
²Università dell'Insubria, Varese

La determinazione della bilirubina nel siero è importante nella diagnostica delle malattie epatobiliari, delle malattie emolitiche e dell'ittero neonatale. Abbiamo valutato l'accuratezza di un metodo per la determinazione della bilirubina totale basato sul metodo di Jendrassik e Grof, calibrato con riferimento alla preparazione SRM 909b del NIST. Le analisi sono state eseguite su analizzatore automatico Olympus AU640 a 37 °C, usando reagenti Sentinel. L'imprecisione è stata valutata mediante analisi della varianza, nell'intervallo di concentrazione 1.63 – 15.61 mg/dL: si sono osservati CV % inferiori a 1.5 per l'imprecisione nella serie ed inferiori a 2.5 per l'imprecisione totale. Il limite di rilevazione, calcolato come somma della media più tre deviazioni standard dei valori misurati in 20 aliquote di materiale privo di bilirubina, è risultato pari a 0. Il metodo è risultato lineare nell'intervallo 0.54 – 26.46 mg/dL, analizzando miscele preparate mediante diluizione scalare di un pool di sieri ad alta concentrazione con un pool di sieri a bassa concentrazione; per l'analisi statistica si è utilizzata la regressione lineare, con l'aggiunta di un test per la linearità. L'esattezza è stata valutata mediante confronto con un analogo metodo, con calibrazione riferibile alla preparazione SRM 916a del NIST: utilizzando l'equazione della retta di regressione non parametrica ($y = 0.99x - 0.02$ mg/dL) si è calcolato che in campioni contenenti bilirubina in concentrazione pari ai livelli decisionali clinici (1.4, 2.5 e 20.0 mg/dL), le concentrazioni di bilirubina misurabili con il metodo candidato risultano pari a 1.4, 2.5 e 19.8 mg/dL, rispettivamente. In miscele contenenti trigliceridi in concentrazione fino a 915 mg/dL, preparate mediante aggiunta di Intralipid 10 %, non si sono osservate variazioni della concentrazione di bilirubina. Analizzando miscele contenenti emoglobina, si è osservata sottostima (19 %) della bilirubina anche in presenza di emoglobina in bassa concentrazione (66 mg/dL). La calibrazione è risultata stabile per 14 giorni. L'intervallo di riferimento, compreso tra i percentili 2.5 e 97.5 di una popolazione di donatori di sangue, è risultato compreso tra 0.16 mg/dL (intervallo di confidenza al 90 %: 0.08 – 0.23 mg/dL) e 1.11 mg/dL (1.04 – 1.18 mg/dL). L'analisi della regressione e l'analisi della varianza hanno evidenziato una differenza non significativa ($p > 0.05$) tra concentrazione nel siero e concentrazione in campioni di plasma raccolti con litio-eparina. Analizzando 95 campioni di siero da pazienti e 11 materiali di calibrazione e di controllo del commercio con il metodo candidato e con il metodo di confronto, tutti i materiali considerati sono risultati commutabili con i sieri da pazienti.

281**A NEW INDIRECT CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY TO MEASURE ANTI-TRANSGLUTAMINASE ANTIBODIES: MORE THAN A PROMISE**

Fasolo M., Guariso G. *, Basso D., Pittoni M., Schiavon S., Fogar P. ^, Greco E., Navaglia F., Zambon C.-F. ^, Plebani M.

Departments of Laboratory Medicine, *Pediatrics and ^Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy.

Anti transglutaminase antibodies (anti-tTG) determination using the human antigen is a very accurate test to diagnose celiac disease (CD). In this study we compared two second generation ELISAs (Celikey tTG and QuantaLite) and anti-endomysial antibodies (EMAs) with a new indirect chemiluminescence immunoassay (LIAISON tTG) in diagnosing and monitoring CD in children. 56 control children, 64 children with histologically proven CD and in 30 CD children on gluten free diet (GFD) were studied. Anti-tTG mean levels measured with any of the three studied methods were significantly higher in CD with respect to controls or GFD children. The sensitivities, for a 100% fixed specificity, were: 89.8% for EMAs, 98.4% for LIAISON tTG (cut-off=7.0 AU/mL), 92.2% for Celikey tTG (4.0 Units/mL) and 94.3% for QuantaLite (55.0 Units). LIAISON tTG or Celikey tTG levels were significantly higher in EMAs 2+ or 3+ than in EMAs negative patients ($F=15.5$, $p<0.001$ and $F=21.3$, $p<0.001$); QuantaLite tTG levels were higher in EMAs 1+, 2+ and 3+ than in EMA negative and in EMAs 3+ patients than in EMAs 1+ patients ($F=31.2$, $p<0.001$). Discriminant analysis to distinguish between CD and controls considering LIAISON tTG alone allowed the correct classification of 79.2% of cases (Chi-square=54.2, $p<0.001$), whereas combined anti-tTG and EMAs allowed the correct classification of 82.8% cases (Chi-square= 32.2, $p<0.001$). 26 CD children were followed up after GFD. The drop in levels of LIAISON tTG was statistically significant (Student's t test for paired data: $t=4.99$, $p<0.001$). A similar pattern was observed for Celikey tTG ($t=4.58$, $p<0.001$) or QuantaLite ($t=6.71$, $p<0.001$). In conclusion the determination of anti-tTG with second generation ELISAs is more effective than EMAs for CD diagnosis. The LIAISON tTG had the highest sensitivity and specificity in the diagnosis of CD. The anti-tTG test is suitable for verifying patient compliance to dietary treatment.

Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Rev Immunol* 2002;2:647-55.

282**VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOMETRICO.**

Peruzzini A., Elengikal P., Gorza R., Pegoretti G., Sicà A.

Laboratorio Patologia Clinica Ospedale S. Chiara TN

La validazione di un metodo di analisi è la dimostrazione oggettiva della sua adeguatezza e consiste in una serie di prove di laboratorio per stabilire se le caratteristiche di un metodo soddisfino le prestazioni per le quali il metodo stesso è applicato. Viene indagato un metodo immunometrico per la determinazione degli oppiacei, tra i più diffusi nei laboratori clinici applicato su analizzatore AxSYM, che utilizza un dosaggio immunologico a fluorescenza polarizzata (FPIA). Sono state prese in esame le maggiori caratteristiche quali: specificità, sensibilità, precisione, recupero, limite di rilevabilità, linearità e incertezza. La specificità del metodo esaminato è complessivamente buona, anche in presenza di modifiche della matrice urinaria. La sensibilità, ricavata dal profilo di imprecisione, è sovente indicata con un CV del 50 %, valore di concentrazione affetto da una DS uguale alla metà del suo valore che porta il limite inferiore dell'intervallo di confidenza (d'ampiezza ± 2 DS) ad estendersi fino a zero. Alternativamente la sensibilità è stata anche stimata, misurando la DS della risposta in corrispondenza del valore 0 di calibrazione, risultando pari a 4.0 ng/ml. La linearità del metodo, non supera 1000 ng/mL in coerenza con il valore dichiarato. L'intervallo di lavoro compreso fra 50 e 360 ng/ml risulta il migliore. Il limite di rilevabilità risulta al di sottodel dichiarato cioè 20 ng/mL, con l'effettiva possibilità di misurare concentrazioni più basse, verificando una sostanziale qualità di attività dell'anticorpo nella zona che contiene anche il valore di cut-off (300 ng/ml). La valutazione del recupero dà un'indicazione sull'esattezza operando con il metodo delle aggiunte note. L'accuratezza è stata calcolata esclusivamente per via statistica, utilizzando i dati del controllo di qualità già raccolti. L'incertezza o errore analitico totale come somma di tutti gli errori legati ai vari passaggi analitici, viene calcolata secondo la teoria di propagazione dell'errore; ma il processo analitico strumentale è a "scatola chiusa" e in definitiva non è determinabile. Si è giunti ad una stima indicativa relativa all'incertezza come somma di tutti gli errori sistematici e casuali, che a sua volta definisce un intervallo da associare al dato ed entro il quale si deve trovare il valore vero con un certo grado di probabilità, in questo caso, si è assunto una probabilità pari a 1,65 DS. L'incertezza tende a dilatarsi all'aumentare della concentrazione in armonia con il valore dell'accuratezza; a dimostrazione di come la parte finale dell'intervallo di lavoro sia particolarmente soggetto ad errori.

Bibliografia: S. Casagrande, D. Castaldi, G. Giurin: elementi di validazione dei metodi di analisi chimica

283

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DELLA PRESENZA DI EMOGLOBINE VARIANTI SUL DOSAGGIO IMMUNOCHEMICO DELL'HbA1c.

Balboni F*.; Terreni A.; Salvadori B.; Caldini A.; Morrocchi B*.; Salati A*.; Vitale V*.; Ognibene A.; and Messeri G.

Laboratorio Generale, Dip. Diagnostica di Laboratorio AOU-Careggi, e Laboratorio IFCA, 50139 Firenze*

Il dosaggio dell'HbA1c, di fondamentale importanza nella gestione del paziente diabetico, può essere effettuato o con metodiche in HPLC in cui la frazione glicata viene misurata in rapporto alla HbA0, o con metodi immunochimici in cui l'HbA1c riconosciuta da un anticorpo monoclonale viene quantificata in rapporto all'emoglobina totale. E' noto che la presenza di varianti emoglobiniche interferisce in entrambe le metodiche (1). Scopo del lavoro era valutare l'entità di tali interferenze confrontando i risultati ottenuti con il sistema Bio-Rad Variant II Dual Kit Program con quelli ottenuti con Olympus HbA1c (test di inibizione dell'agglutinazione al lattice) su AU400, in 18 campioni di sangue provenienti da pazienti portatori di Hb varianti. I risultati ottenuti con le due metodiche sono presentati in tabella.

n	HPLC	Olympus	Variante
1	4.9	5.4	Hb Stanleyville II 39%
2	4.9	5.2	Hb Stanleyville II 40%
3	7.1	7.7	Hb J 21%
4	7.1	5.9	Hb J 21%
5	7	8.2	Hb J 21%
6	4.8	5.7	Hb J 21%
7	6.9	8.2	Hb S 34%
8	5.8	7.9	Hb S 35%
9	6	6.7	Hb S 37%
10	6	7.8	Hb S 37%
11	5	5.5	Hb S 2.1%
12	5.3	6.4	HbS 30%
13	5.2	6.6	HbS 34%
14	7	7.7	HbS 34%
15	n.v	5.3	HbS 84%, HbA0 3.6
16	n.v	5.9	HbSC con HbA0 2.6
17	5	5.2	incremento Hb fetale
18	n.v	3.2	variante veloce HbA0 22.3%

L'analisi di Bland-Altman mette in evidenza una sovrastima del metodo immunochimico rispetto all'HPLC (differenza media 0.8 HbA1c%; limite di accettabilità NGSP +/-1%) tranne un unico caso di sottostima, confermando comunque la buona correlazione tra i due metodi riportata in letteratura. Mentre il dosaggio in HPLC separando le diverse forme di Hb consente di evidenziare quei casi in cui la

scarsa concentrazione di HbA0 rende la misura dell'HbA1c inattendibile (caso 15,16,18), questo non è possibile col dosaggio immunochimico in cui l'anticorpo si lega con diversa affinità alle forme glicate delle varianti, fornendo comunque un risultato. Con la trasformazione in senso multietnico della società, sono sempre più frequenti i pazienti diabetici portatori di varianti, rendendo quindi raccomandabile l'utilizzo dei metodi cromatografici in cui la visualizzazione del tracciato permette una valutazione qualitativa delle emoglobine.

1. Lynn Bry, Philip C. Chen, and David B. Sacks. Clinical Chemistry 47:2153-163 (2001)

284

PARAPROTEIN INTERFERENCE IN THE OLYMPUS CONJUGATED BILIRUBIN ASSAY

¹Barassi A., ²Merlini G., ³Nauti A., ⁴Melzi d'Eril G.V.
¹DSBSC, Univ. degli Studi dell'Insubria, Varese. ²Lab. di Biotec., IRCCS Policlinico S. Matteo, Dip. di Bioch., Univ. degli Studi di Pavia. ³Lab. di Analisi, Osp. di Circolo, Varese. ⁴Dip. di Med., Chir. e Odont., Univ. degli Studi di Milano.

Paraprotein interference in automated chemistry is uncommon. We describe three patients (A, B and C) with IgG- κ -type myeloma and falsely elevated conjugated bilirubin (CB) levels erroneously measured using the Olympus CB assay on Olympus AU2700 analyzer. The Olympus serum total bilirubin assay used is an end-point chromogenic assay. The reagent contains an "accelerator" (caffeine), to solubilize unconjugated bilirubin, together with a diazonium salt (2,5 dichlorophenyl diazonium tetrafluoroborate), in presence of surfactant to avoid protein precipitation, in a weakly acid medium (pH, 5). For the determination of the conjugated fraction, the solubilizing agent and the surfactant are lacking in the reagent and the medium is strongly acid (pH, 1). In order to avoid the protein precipitation, this reagent contains a "protein stabilising agent". For patient A (man, 40y) the reported CB was 37.5 mg/L, total bilirubin 2.0 mg/L (reference range, 0.0 – 11.0 mg/L), total protein 156 g/L with a monoclonal IgG- κ component of 104.1 g/L. For patient B (man, 64y) the reported CB was 12.0 mg/L, total bilirubin 3.3 mg/L, total protein 89 g/L with a monoclonal IgG- κ component of 25.9 g/L. For patient C (woman, 42y) the reported CB was 10.9 mg/L, total bilirubin 2.0 mg/L, total protein 136 g/L with a monoclonal IgG- κ component of 97.2 g/L. Visual inspection of the assay demonstrated that after the reagent addition the increase in absorbance during the reaction was attributable to the formation of a white insoluble precipitate. This turbidity, rather than the expected colour change to pink, increased the absorbance and falsely elevated the CB. Serum from the three patients were anicteric and CB measured using an alternative method (dry-chemistry) was in the normal range. Moreover, the concentration of CB was sharply decreased in the serum ultrafiltrate (molecular mass exclusion, 30 kDa) of the three myeloma patients by more than twenty-, thirty-fold. These findings suggest that the most likely cause of the interference was the monoclonal immunoglobulin which precipitates at very low pH in absence of surfactant. Probably, the "stabilizing agent" works at a normal level of serum proteins, but at much higher concentration of certain proteins, like those generated by myeloma described here, the "agent" is not able to keep them in solution leading to precipitation. Based on our series of patients with monoclonal gammopathies, the incidence of immunoglobulin interfering with the Olympus CB assay is very low. Out of the approximately 200 serum samples containing a monoclonal protein tested for conjugated bilirubin during the year 2004, only the 3 reported here showed an erratic behaviour.

Bibliography. Smorgorzewska A. et al. Clin Chem 2004;50:1691-3.

285

VALUTAZIONE DI UN METODO ENZIMATICO PER IL DOSAGGIO DI OMOCISTEINA: CONFRONTO TRA HPLC E AxSYM.

Zappacosta B.¹, Persichilli S.², Minucci A.², Scribano D.², Baroni S.², Fasanella S.², Neri P.², Dalloiso PD.³, Giardina B.² e De Sole P.².

¹Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del Sacro Cuore - Campobasso

²Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Background: l'omocisteina è un importante fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, ma anche un marker funzionale di deficit di vitamine. La determinazione dell'omocisteina è sempre più diffusa, soprattutto grazie all'avvento di test immunoenzimatici, facilmente reperibili in commercio, che permettono un dosaggio più rapido e semplice rispetto ai tradizionali metodi di riferimento come HPLC e GC.MS.

Gli analizzatori per le determinazioni immunoenzimatiche tuttavia, per gli elevati costi di gestione, non sono sempre alla portata di tutti i laboratori, per cui negli ultimi anni è emersa la necessità di sviluppare dosaggi di tipo enzimatico-spettofotometrico per la determinazione dell'omocisteina con possibilità di applicazione sui più diffusi analizzatori di chimica clinica ed ovvie ripercussioni di natura economica.

Metodi: in questo lavoro è stato valutato un nuovo metodo colorimetrico enzimatico (Carolina Liquid Chemistries) confrontando i valori di omocisteina ottenuti con questo test con quelli ottenuti con il metodo di riferimento HPLC e con un metodo immunoenzimatico (Abbott AxSYM immunoassay) in uso nel nostro laboratorio.

Risultati: l'analisi di regressione lineare indica che il metodo enzimatico mostra una buona correlazione con entrambi i metodi HPLC e AxSYM fino a valori di omocisteina di 20 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2=0.87$ e 0.88 rispettivamente per HPLC e AxSYM), mentre la correlazione nell'intero intervallo dei valori studiati è meno significativa ($R_2 = 0.75$ per l'HPLC e 0.76 per l'AxSYM).

Il confronto delle differenze mostra che il metodo enzimatico sovrastima i valori dell'omocisteina soprattutto per i valori superiori a 20 $\mu\text{mol/L}$.

Conclusioni: il metodo enzimatico, pur mostrando una buona linearità all'interno del range preso in considerazione (3-90 $\mu\text{mol/L}$), presenta dei limiti soprattutto nell'intervallo di valori superiori a 20 $\mu\text{mol/L}$.

Un utilizzo di questo metodo nella determinazione routinaria dell'omocisteina suggerirebbe pertanto un suo perfezionamento forse nella stessa configurazione delle sequenze enzimatiche che lo caratterizzano

286**PRATICABILITA' DELLO STRUMENTO HY.TEC 288 PER LA DETERMINAZIONE DI IGE SPECIFICHE**

° Folli D., ~ Banfi M., ° Granata S., ~ Prencipe L.
 ° Laboratorio di Biochimica Clinica A. O. Niguarda
 P.zza Ospedale Maggiore 3, 20162 MILANO
 ~Laboratorio Analisi A.O. Vimercate Via C. Battisti 23,
 20059 VIMERCATE

La determinazione delle IgE specifiche con metodi automatizzati è ormai una realtà nel laboratorio di allergologia.

Scopo. In questo studio è stato valutato lo strumento HY.TEC 288 (HYCOR), distribuito da ASTRA srl (MILANO) sotto l'aspetto della praticabilità.

Materiali e metodi. Il principio del test è un ELISA. La praticabilità del sistema è stata determinata basandoci sui criteri proposti da Stockman et al.¹, che prendono in esame i differenti attributi del sistema analitico assegnando a ciascuno una votazione da 0 fino a 10. Gli attributi valutati sono: ambiente, disposizione nello spazio, training/operatività, start up/shut down, processazione dei campioni, utilizzo dei reagenti, flusso di lavoro, tempi, monitoraggio, calibrazione, controllo di qualità, processazione dei risultati, versatilità, manutenzione. Abbiamo poi calcolato una mediana e un range di votazione applicando i seguenti criteri:

0 – 3.3 non incontra le richieste

3.4 – 6.6 incontra le richieste

6.7 – 10 eccede le richieste

Durante il periodo di familiarizzazione con lo strumento, durato circa due mesi, sono state eseguite alcune sedute analitiche con relative curve di calibrazione. Da queste abbiamo determinato i coefficienti di variazione per quanto riguarda le assorbanze. I calibratori utilizzati appartenevano a lotti diversi.

Risultati. Per quanto riguarda la praticabilità, la media delle mediane ottenute per ogni singolo attributo risulta essere pari a 7.8 e il range delle votazioni va da 4 a 9.

I risultati ottenuti per le calibrazioni sono i seguenti: per lo standard con valore 0.35 ng/mL un CV delle assorbanze pari a 20.2%; per 0.70 ng/mL CV 14.4%; per 3.5 ng/mL CV 18.8%; per 17.5 ng/mL CV 12.4% e per 100 ng/mL CV 8.8%.

La precisione valutata su un campione con valori vicino al cut off è pari al 12.9%.

Conclusioni. La praticabilità del sistema risulta essere accettabile in quanto la votazione ottenuta per i diversi attributi soddisfa le richieste.

Anche la ripetibilità valutata attraverso i calibratori si è rivelata accettabile soprattutto se si considera che gli standard appartenevano a lotti diversi.

Bibliografia. ¹Evaluation Methods in Laboratory Medicine, Haeckel R, Edited by Rainer Haeckel, Weinheim (Germany), 1993, pagg.185-201

287**EVIDENCE-BASED LABORATORY MEDICINE: ETHICAL ISSUES AND PRACTICAL CONSEQUENCES.**

Sacchini D. *, De Sole P.**, Bruno G.***, Giardina B.**
 Istituti di *Bioetica e di **Biochimica e Biochimica clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo F. Vito 1, 00168 Roma, Italia.

Objective - The recognition of the ethical issues concerning the evidence based laboratory medicine (EBLM) and the practical perspectives in the laboratory medicine (LM).

Methodology - Review of international literature and documentation.

Results - EBLM is widespread in LM. The advantages of EBLM and guidelines are the following: 1. availability of systematic reviews about effectiveness of laboratory diagnostic tests; 2. improvement of appropriateness for the patient and for a fair resource allocation; 3. the chance to elaborate adequate laboratory diagnostics guidelines.

The disadvantages, with ethical relevance, are, as follows: 1. both EBLM and guidelines suffer of the structural limitations of being limited in coverage, since only procedures in principle not necessary can become object of evidence; 2. they are both limited in their applicability to the individual patient, since the statistical inference on which they are based is applicable to populations, not to individuals; 3. the possible biases; 4. they cannot restrict the patient's right to the best available treatment, nor the physician's right/duty to apply to each patient (with the eventual counselling of laboratory specialist) the diagnostic and therapeutic approach considered most suitable for that patient under those specific conditions.

Conclusions: The physician's compliance with the information originated by EBLM and with the recommendations from the laboratory practice guidelines could guarantee that no major mistakes have been done, but it is always necessary to pay attention to work for the best individual patient's interest.

Bibliography: Price C.P., *Evidence-based laboratory medicine: supporting decision-making*, Clin. Chem. 2000 Aug;46: 1041-50.

288

THELAZIA IN OCCHIO UMANO: CASO IN ITALIA

Signori D., Nemetz L., Dalla Corte G., Riva R.*
Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia e *
Divisione di Oculistica dell'ULSS 2 - Feltre (BL)

Introduzione. L'infestazione da *Thelazia* negli animali domestici in Italia è stata descritta dal 1429 (Grisoni B.) fino ai giorni nostri^{1,2}, ma non nell'uomo.

Le thelazie, piccoli nematodi parassiti di mammiferi e uccelli, hanno i mucidi come ospiti vettori e intermedi e definitivi i vermi adulti. Vivono in congiuntiva e doti escretori lacrimali. Descritte circa 13 specie di *Thelazia*, solo due possono occasionalmente infestare l'uomo: *T. callipaeda*, Sud est asiatico (Giappone e Corea³), Russia asiatica e Cina e *T. californiensis*, presente negli USA.

Caso clinico. Un uomo di 34 anni, residente in provincia di Belluno, impiegato, hobby della fotografia, reduce da un viaggio in Puglia in settembre 2002 e da uno nell'area ovest del Cameroun in dicembre, a febbraio 2003, 45 giorni dopo il rientro, lamenta bruciore e arrossamento a un occhio che cura con collirio antinfiammatorio. A causa del persistere del disturbo, a marzo 2003 si sottopone a visita oculistica, che rileva abrasioni corneali e alcuni piccoli vermi emergere dal sacco congiuntivale.

Risultati. Prelevati dal fornice congiuntivale inferiore tre vermi cilindrici: due, mal conservati, femmina e maschio di 10 e 6 mm di lunghezza; il terzo è una femmina, sottile, biancastra, di circa 12 mm (Fig.1). L'esame morfologico mostra un'apertura buccale rotondeggiante centrale all'estremità cefalica appuntita, da cui parte un esofago relativamente corto (Fig. 2); un apparato uterino pieno di uova e embrioni a diversi stadi di sviluppo (Fig. 3); una coda arrotondata (Fig. 4) e permette di identificare i parassiti come nematodi.

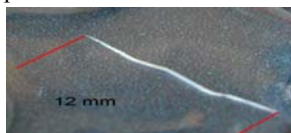


Fig. 1



Fig. 2

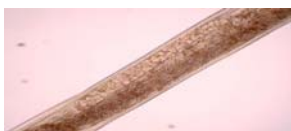


Fig. 3



Fig. 4

Il paziente viene inviato al Centro Malattie tropicali presso l'Ospedale Sacro Cuore di Negrar (VR), e gli esemplari trasferiti al Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna.

Successivi esami oftalmologici escludono la presenza di parassiti residui e non vi è necessità di terapia medica.

Conclusioni. Le caratteristiche morfometriche⁴ consentono di identificare i vermi come appartenenti al genere *Thelazia* (Nematoda: Thelaziidae), non di riferirli alla specie, ma si esclude l'appartenenza a specie descritte in Italia, ed è presumibile che l'infestazione sia stata contratta durante il soggiorno in Cameroun.

Bibliografia

1. Giangaspero A. *et al.* Parassitologia 1999; 545-48.
2. Otranto D. *et al.* Parasitology 2003; 365-73.
3. Choi W.I. *et al.* Korean J Parasitol. 1989; 217-223
4. Pampiglione S. *et al.* Parassitologia 2004; 123.

289

ATTIVAZIONE DI UNA TASK FORCE PER UN PERCORSO ALLERGOLOGICO INTEGRATO E POLISPECIALISTICO

*Scacchetti A.T., *Canali C., ^Corbetta L., *Carbonieri A.

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche
^Amb.di Allergologia Respiratoria (Pneumologia)
A.O. Universitaria Policlinico di Modena

Premessa. Le patologie allergiche respiratorie, oculari e cutanee colpiscono il 30% della popolazione generale con notevole impatto economico sulle strutture sanitarie. I medici di medicina generale (MMG) si trovano spesso di fronte a pazienti allergici con patologia multiorgano (cute, occhi, apparato respiratorio) che necessiterebbero di un approccio multispecialistico di difficile attuazione dal momento che devono essere coinvolte simultaneamente diverse U. Operative (Laboratorio, Pneumologia, Dermatologia, Otorinolaringoiatria, Pediatria,) e mancano percorsi organizzativi impostati ad hoc.

Scopi del progetto: Impostare una collaborazione con i reparti coinvolti nel trattamento delle patologie allergiche multiorgano al fine di migliorare il percorso diagnostico sotto il profilo della appropriatezza delle prescrizioni e dei tempi di attesa ed incentivare le collaborazioni interdisciplinari nella messa a punto di protocolli aggiornati per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie allergiche.

Metodologia: È stato identificato l'Ambulatorio di Allergologia Respiratoria (Pneumologia) come il primo reparto con cui sperimentare un percorso condiviso ed integrato che permettesse al paziente di eseguire i test allergologici in vitro ogni volta che, nell'ambito della visita, il clinico riscontrasse la necessità di procedere alla ricerca di IgE specifiche mirate, evitando quindi il rinvio del paziente al Medico di base (MMG).

Il gruppo di pazienti così trattato è stato confrontato con un campione "random" di richieste del Centro Prelievi utilizzando come indicatori:

- a) il numero degli allergeni testati per richiesta,
- b) la percentuale di riscontri positivi,
- c) il tempo per la risposta.

Risultati: Durante l'anno 2004 sono stati indirizzati in questo canale preferenziale 100 pazienti. Il confronto con il campione di controllo ha portato a rilevare una differenza significativa sui 3 indicatori scelti tra i due gruppi analizzati:

- a) 7/12; b) 70%/20%; c) 6gg/9gg

Conclusioni: I risultati sono stati sicuramente positivi per i pazienti, ma anche per i professionisti che hanno avuto modo di confrontarsi e di modificare alcuni percorsi diagnostici. È necessario estendere il coinvolgimento alle altre Unità Operative per dare completa attuazione all'esigenza di multidisciplinarietà dei casi trattati.

290

VECCHIE E NUOVE SFIDE DELLA MEDICINA DI LABORATORIO:IL CONFRONTO CON I MEDICI DI MEDICINA GENERALE (MMG)

*Carbonieri A,*Melegari A.,*Scacchetti T,*Simoni L
 ^Piancone C,^Bonesi M.G,^Mazzi W,^Razzaboni G.
 * A.O. Universitaria Policlinico di Modena,
 ^ Medicina di Base AUSL Modena

Premessa. L'utilizzo degli esami specialistici da parte dei MMG risente della difficoltà di tenersi aggiornati su campi che sono in rapida evoluzione, spesso per patologie che hanno una prevalenza molto limitata sull'utenza esterna e quindi sono molto rare da riscontrare nelle visite quotidiane. L'invio del paziente allo specialista di tutti i casi sospetti crea un allungamento ingiustificato delle liste di attesa che può essere evitato attraverso l'adozione di percorsi diagnostici validati e concordati con clinici e laboratoristi.

Obiettivi. Confrontarsi con i MMG per:

- migliorare l'utilizzo dei test diagnostici specialistici (richiesta e interpretazione dei risultati),
- cercare di chiarire il ruolo che MMG, Laboratoristi e Clinici Specialisti possono svolgere per assicurare al paziente un iter diagnostico efficiente ed efficace
- raccogliere spunti per migliorare anche gli aspetti organizzativi e burocratici.

Materiali e metodi. In stretta collaborazione con MGform organizzazione degli animatori di formazione dei Medici di Base dell'AUSL di Modena, è stato organizzato un evento (3 incontri), accreditato ECM, in cui i partecipanti hanno discusso sulla validità di indagini diagnostiche di recente introduzione nell'ambito dello studio delle trombofilie, della malattia celiaca nell'adulto, delle malattie autoimmuni sistemiche, e delle atopie. Attraverso la discussione di casi clinici presentati dagli animatori e commentati da due tutor (clinico e laboratorista) i partecipanti, suddivisi in 3 gruppi, hanno trattato l'utilizzo appropriato di alcuni test specialistici, di screening e di approfondimento, per arrivare alla condivisione di protocolli diagnostici ispirati alle raccomandazioni delle Società Scientifiche di riferimento.

Risultati. Hanno partecipato all'evento 54 iscritti di cui 41 MMG, 6 Laboratoristi e 5 Medici Ospedalieri Sono stati molto apprezzati i chiarimenti sulla interpretazione dei risultati, sulle condizioni di monitoraggio e sono state individuate alcune criticità quali: la difficoltà di applicare i percorsi di approfondimento e di svolgere un ruolo attivo sulle prescrizioni effettuate a seguito di visite specialistiche.

Conclusioni. Si è convenuto di mantenere "mobilitato" il gruppo attraverso un appuntamento autunnale nel quale verranno concordate ulteriori linee di collaborazione e di verifica di quanto stabilito.

291

DETERMINAZIONE MULTICENTRICA DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER SODIO E POTASSIO (3)

Carobene A.⁹, Alberino F.¹, Burighel A.¹, Gion M.², Cocco G.², Roncoroni G.³, Bossi G.³, Suigo E.⁴, Rosso R.⁴, Manzato F.⁵, Chiozzi M.⁵, Mayr A.⁶, Wierer B.⁶, Mori M.⁷, Borgiani L.⁷, Schinella M.⁸, Giordani E.⁸, Ceriotti F.⁹, Guerra E.⁹, Ferrero C.A.⁹, Bonvicini P.¹⁰, Venturini R.¹⁰, Plebani M.¹⁰

1 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Dolo (VE)

2 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Venezia

3 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese

4 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano" – stabilimento di Magenta

5 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Mantova

6 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Brunico (BZ)

7 Laboratorio Analisi, E.O. Ospedali Galliera, Genova

8 Laboratorio Analisi, di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine, Rovereto (TN)

9 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano

10 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Scopo del lavoro è quello di studiare gli intervalli di riferimento del sodio e del potassio delle popolazioni di individui "sani" afferenti a 9 diversi laboratori.

Materiali e metodi. Vedi anche Abstract "Verifica della commutabilità dei sieri NIST per Colesterolo, Acido Urico, Sodio e Potassio". Ogni giorno, per un massimo di 25 giorni lavorativi, sono stati raccolti campioni di circa 20 individui "sani" ed analizzati in singolo insieme ai 2 sieri NIST, materiali commutabili, e a un pool congelato preparato da ciascun centro utilizzato come CQI. Sistemi analitici: 8 sistemi Olympus e 1 sistema Roche con reattivi dedicati.

Risultati. Sono stati eliminati tutti i pazienti con Creatinina maggiore di 1.5 mg/dL e Glucosio maggiore di 126 mg/dL e tutti i dati di ciascun giorno in cui almeno un siero NIST risultava al di fuori dei limiti di ETa utilizzati nella VEQ PROLARIT. I dati dei pazienti dei singoli centri sono quindi stati combinati in un'unica popolazione. In tabella riportiamo i valori di sodio e potassio al 2.5° e 97.5° percentile.

	Media (mmol/L)	Mediana (mmol/L)	2.5 °	97.5°	N°
Sodio	140.4	140.0	136.0	144.0	2154
Potassio	4.18	4.13	3.55	5.08	2438

Entrambe le distribuzioni risultano significative per curtosi mentre solo la popolazione del potassio risulta asimmetrica, scodata verso destra.

Conclusioni: I risultati ottenuti sul sodio sono in accordo con le pubblicazioni più recenti anche se l'intervallo risulta essere più ristretto da quello atteso. Al contrario l'intervallo di riferimento del potassio sostanzialmente è in accordo con quello più spesso utilizzato dai laboratori partecipanti anche se si notano significative differenze fra i vari centri.

Bibliografia: P. Rustad et al. Scand J Clin Lab Invest 2004; 64: 271-284.

292**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEURAL STEM CELL LINE DERIVED FROM HUMAN FETAL CORTEX**Cacci E.¹, Villa A.², Lindvall O.¹, Martinez-Serrano A.², Kokaia Z.¹¹Laboratory of Neural Stem Cell Biology, Section of Restorative Neurology, University Hospital, and Lund Strategic Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Sweden. ² Center of Molecular Biology Severo Ochoa., Autonomous University of Madrid - C.S.I.C., Campus Cantoblanco.Madrid, Spain.

Epigenetic and genetic immortalization strategies can be combined to perpetuate human neural stem cells (hNSC). By using v-myc oncogene based immortalization strategy, we have clonally isolated a hNSC line from fetal cortex and characterized its properties under different culture conditions. Immunocytochemical staining revealed that under passaging/proliferating conditions (20 ng/ml EGF/FGF) virtually all cells express nestin and vimentin, thus retaining the characteristics of neural precursors. When differentiated for 12 days (by removing both EGF and FGF), cells gave rise to both glial (GFAP positive cells) and neuronal (15-20% positive for the neuronal marker, β III tubulin) phenotype. We found that cells expressing β III tubulin were also positive for GABA. Both EGF and FGF were required to support their division and self-renewal. Five days after growth factors withdrawal cell proliferation was dramatically reduced as revealed by comparison of the number of Ki67-positive cells before and after withdrawal. By using RT-PCR, we observed that in the absence of growth factors, v-myc expression, was down regulated as well. Finally, by RT-PCR we studied the expression of genes which are associated with regionalization and cell commitment of precursors of the cortical area during embryonic development. We found that our cell line expressed some of these genes such as Pax6, Emx-2 and Neurogenin-2. Based on our data, we believe that this cell line represents an useful source of cells for pre-clinical transplantation studies, to test the potentiality of hNSCs to replace dead and damaged cells in an animal model of stroke (ongoing experiments). Taking advantage of its homogeneity, this cell line can also be used for better understanding of the role of the intrinsic and extrinsic factors in mechanisms regulating different properties of neural stem cells.

Reference:

Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S42-50.**293****NUOVO TEST GRAFICO PER LA VALUTAZIONE DEL GRADO DI ACCORDO TRA METODI DI MISURA**Sotgia S., Zinellu A., Deiana L., Carru C.
Dipartimento di Scienze Biomediche, Cattedra di Biochimica Clinica – Università di Sassari

Se da un lato non vi è tra i laboratoristi una piena convergenza circa quali debbano essere i limiti di accettabilità del grado di disaccordo tra metodi analitici al fine di stabilire se vi siano o meno differenze significative nei risultati ottenuti, dall'altro poche resistenze si registrano nell'utilizzo del metodo grafico per tale valutazione. La semplicità e allo stesso tempo l'efficacia di questa strategia è senz'altro il suo punto di forza. Infatti, indipendentemente dal tipo di test grafico utilizzato, l'alto valore informativo della distribuzione che ne risulta è, oltre che immediatamente percettibile visivamente, preferibile a lunghe e tediose elaborazioni di tipo statistico che, proprio per la mancanza di universalità nei criteri di accettabilità, a fine elaborazione potrebbero rivelarsi oltre che inutili anche di non facile comprensione. A dimostrazione dell'importanza dell'impatto visivo che scaturisce da una comparazione di tipo grafico dei dati, si può citare il metodo della regressione lineare. Questo metodo, tranne che in rari casi è assolutamente inefficace nello stabilire l'accordo tra differenti serie di misurazioni. Nonostante ciò è probabilmente il metodo di comparazione maggiormente utilizzato in quanto è di facile realizzazione, comprensione e ha un notevole impatto visivo. Senza voler aggiungere nulla alla sempre attuale diatriba sui limiti di accettabilità, in questo lavoro presentiamo un nuovo metodo di comparazione grafica dei dati, realizzabile con un comune foglio di calcolo quale è Microsoft Excel. In sostanza, dopo aver calcolato punto per punto la media tra i valori che si ottengono tra due o più determinazioni ottenute, per esempio, utilizzando metodi analitici differenti, si diagrammano i punti singoli contro i valori medi precedentemente calcolati. In questo modo è possibile osservare come i valori dei differenti dosaggi variano con i valori medi calcolati punto per punto. Qualitativamente, eventuali differenze tra i valori e quindi tra i metodi analitici utilizzati per determinarli, sono immediatamente percettibili sulla base dell'entità della sovrapposizione dei vari punti. Per una valutazione quantitativa delle differenze invece è sufficiente osservare eventuali differenze nella scala delle ordinate, le quali sono calcolate automaticamente dal foglio di calcolo. Il nostro metodo presenta tutti i requisiti di un test di comparazione grafico [1]: è di semplice realizzazione, comprensione e ha un forte impatto visivo. Differenze qualitative e quantitative tra i valori da confrontare sono facilmente individuabili visivamente.

[1] S Eksborg *Clin Chem*, 1981; (27) 1311 - 1312

294

DATI PRELIMINARI NELLA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE IgE SPECIFICHE IN SOGGETTI DI ETÀ PEDIATRICA.

Giovanetti C., Polidori M., Carosella R., Ruffini I., De Marco E.
 Servizio Laboratorio Analisi, Ospedale "G. Bernabeo" Ortona, Primario Prof. Nubile G., ASL-Chieti

Introduzione. L'allergia rappresenta una delle più importanti patologie cronicizzanti. Dal momento che gli individui atopici sviluppano allergia durante l'infanzia e che l'insorgenza precoce sembra essere associata a manifestazioni cliniche più gravi, la prevalenza della malattia tra i bambini è una stima della vastità del problema. Lo sviluppo dell'allergia è un processo dinamico, caratterizzato sia dalla predisposizione genetica che dall'esposizione all'allergene, attraverso cui si arriva alla sensibilizzazione e alla sintomatologia clinica con la produzione di anticorpi IgE Specifici. La valutazione degli anticorpi IgE permette di identificare gli individui atopici, di determinare gli allergeni, di monitorare l'evoluzione dell'allergia. Le concentrazioni ematiche degli anticorpi IgE variano con l'età, aumentano progressivamente fino ai 10 anni, si stabilizzano verso i 15-20 anni sui valori dell'adulto (100kU/L, cat-off diagnostico) e si elevano durante la manifestazione allergica. Lo sviluppo della sensibilizzazione verso gli allergeni di tipo inalante si verifica prevalentemente dopo la prima infanzia e aumentano oltre il terzo anno di vita. Per tale motivo abbiamo voluto indagare, con dati preliminari, la dinamicità evolutiva dell'atopia nel bambino, attraverso l'incidenza e la prevalenza degli allergeni di tipo inalante con il progredire dell'età.

Materiali e metodi. Per tale studio sono stati monitorati pazienti in età pediatrica (12mesi-10anni) degli ultimi 5 anni sottoposti a test di controllo nel 2005. I valori di riferimento per le IgE Totali (13-85kU/L) sono stati utilizzati come cat-off diagnostico di positività; il "range" di riferimento per le IgE Specifiche Inalanti (0.35-100 kU/L) è stato utilizzato per valutare la sensibilizzazione all'allergene specifico. La determinazione quantitativa dei livelli ematici delle IgE Totali e Specifiche è stata effettuata con un sistema diagnostico in vitro, dosaggio UniCAP, Total IgE e Specific IgE, (Pharmacia Diagnostics) ed eseguito con lo strumento UniCAP100.

Risultati. su 25 pazienti positivi al dosaggio delle IgE Totali, 14 erano negativi al test per le IgE Specifiche Inalanti, di cui 5 si sono positivizzati nell'arco dei 5 anni; dei restanti 11, positivi al primo test, solo 4 si sono negativizzati.

Conclusioni. La valutazione quantitativa sia delle IgE Totali che IgE Specifiche, definiscono lo sviluppo della malattia allergica a partire dalla prima infanzia, e tale valutazione può essere un valido strumento sia per la diagnosi precoce che per la prognosi e il follow-up.

Bibliografia. Ahlstedt S. Understanding the usefulness of specific IgE tests in allergy. Clin Exp Allergy 2002;32,11-16.

295

DOSAGGIO DEGLI ACIDI BILIARI NEL LIQUIDO DI LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE

Zecca E.¹, Baroni S.², Mascagna G.², De Luca D.¹, Romagnoli C.¹, Zuppi C.²

¹Istituto di Pediatria - Divisione di Neonatologia e ² Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica. Università Cattolica del sacro Cuore. Policlinico A. Gemelli. Roma

Gli acidi biliari sono considerati i principali responsabili delle complicanze fetali (aumentata incidenza di prematurità e di morte endouterina) associate a gravidanze con colestasi intraepatica. Studi sperimentali hanno da tempo evidenziato che l'aspirazione di bile è in grado di provocare sull'apparato respiratorio gravi effetti lesivi fino ad una severa polmonite chimica. Recentemente la colestasi gravidica è stata chiamata in causa, proprio attraverso gli alti livelli di acidi biliari che comporta, nella genesi dell'RDS (Respiratory Distress Syndrome) nel neonato a termine e senza altri fattori di rischio per RDS. Gli acidi biliari sembrerebbero, infatti, invertire la reazione catalizzata dalla fosfolipasi A2 nel polmone causando degradazione della fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina e quindi perdita dell'attività del surfattante.

Abbiamo quindi pensato di dosare gli acidi biliari nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) di neonati a termine con e senza RDS.

Il BAL era stoccato in aliquote e congelato a -80° C fino al momento del dosaggio. Abbiamo utilizzato il kit enzimatico colorimetrico Sentinel per acidi biliari totali, automatizzato su analizzatore Olympus AU400, modificando la calibrazione, curva a 4 punti nel range 0 - 5.0 umol/L. Come controllo è utilizzato lo standard Sentinel (valore 4.3 umol/L) diluito con fisiologica fino a 0.3 umol/L.

Abbiamo trovato acidi biliari indosabili in 13 BAL, valori di 0.2-0.3 umol/L in 3 BAL, di 1.0-1.6 umol/L in 2 BAL ed in un unico campione di BAL abbiamo ottenuto 3.5 umol/L.

I campioni con acidi biliari dosabili appartenevano tutti a neonati figli di madri con colestasi gravidica. Il BAL con valore di 3.5 umol/L era di un neonato a termine con grave RDS alla nascita, anche se gli indici di maturità polmonare nel liquido amniotico erano risultati buoni; la presenza di alti livelli di acidi biliari sierici e la grave sintomatologia respiratoria avevano fatto fortemente sospettare una polmonite "chimica" da acidi biliari. La presenza di acidi biliari nel BAL di neonati figli di madre con colestasi gravidica, che presentino RDS, potrebbe confermare la patogenesi dell'RDS in tali casi e guidare la terapia attraverso la somministrazione supplementiva di surfattante per via endotracheale.

Zecca E, Costa S, Lauriola V, Vento G, Papacci P, Romagnoli C. Bile acid pneumonia: a "new" form of respiratory distress syndrome ? Pediatrics 2004; 114: 269-72.

296**LA FUNZIONE DEL LABORATORIO NELLA PERSONALIZZAZIONE DELLA TERAPIA DIALITICA IN DIALISI PERITONEALE**

Bassi L., Conti E., Rizzardi S.
Azienda Istituti Ospitalieri, Laboratorio analisi
Viale Concordia 1- 26100 Cremona

Scopo: La collaborazione tra l'Ambulatorio di Dialisi peritoneale e il Laboratorio Analisi ha permesso la personalizzazione della terapia dialitica per ogni paziente, attraverso la stesura di una procedura per l'esecuzione e la refertazione del P.E.T.

Il P.E.T. (Peritoneal Equilibration Test) è un test diagnostico che permette di studiare le caratteristiche funzionali della membrana peritoneale allo scopo di scegliere , per ciascun paziente , la tecnica dialitica più idonea.

Sono utilizzate tecniche di dialisi peritoneali che si differenziano in manuali (CAPD-DAPD) e automatizzate (CCPD-IPD-NIPD) con una prevalenza di quella manuale. Il P.E.T. viene eseguito dopo circa un mese dall' inizio della dialisi peritoneale e successivamente una volta all' anno come controllo.

Materiali e metodi : Il P.E.T dura 4 ore e consiste nell' infusione , attraverso un catetere , di una sacca di glucosio al 2.27 % nella cavità addominale. A intervalli di tempo definiti (0-2-4 ore per il liquido di dialisi e 0-2 ore per il sangue) si eseguono prelievi di dialisato e sangue .

I prelievi di sangue e dialisato vengono inviati al laboratorio e analizzati su Modular Roche per la determinazione di azoto, creatinina e glucosio .

I risultati sono trasmessi all'ambulatorio di Dialisi Peritoneale tramite un modulo predisposto, concordato con il reparto, e valutati dal medico di reparto.

Sono stati analizzati 47 pazienti e si sono valutate le variazioni del PET e le insorgenze di complicanze quali peritoniti. In 22 pazienti si è osservata una variazione del PET rispetto al basale e le peritoniti sono state 0.08+/-0.17 episodi/mesi/paziente (p.0.272 n.s.)

Risultati : Dai nostri dati non sembrano emergere effetti a lungo termine dovuti all'uso di soluzioni dialitiche, né per effetto di peritoniti insorte nel periodo di osservazione. Pur essendo la peritonite la principale complicanza della terapia le cause di drop out della metodica sono la morte del paziente (72 %) o il passaggio a emodialisi (20 %) o il trapianto (5 %). Sicuramente con la dialisi peritoneale domiciliare e il controllo periodico del PET si è offerto ai pazienti un migliore regime di vita e si è avuta una più alta sopravvivenza (50 %) dei pazienti ancora in trattamento dopo 45.5 mesi.

297**EFFETTO DEL FUMO DI SIGARETTA SULLA FUNZIONALITA' DEI LEUCOCITI POLIMORFONUCLEATI**

Persichilli S., Maugeri N*, Papini S*, Minucci A., Scribano D., Fasanella S., Neri P., Antenucci M., Giardina B., Zappacosta B*.

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

*Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del Sacro Cuore - Campobasso

Introduzione. Sono ormai noti da tempo gli effetti nocivi che il fumo di sigaretta esercita sull'organismo umano che si traducono in quadri patologici a carico di diversi sistemi, quali la malattia coronarica, le neoplasie e le flogosi croniche a carico dell'apparato respiratorio. In un recente lavoro è stato valutato l'effetto del fumo di sigaretta sui leucociti polimorfonucleati (PMNs), evidenziando una sostanziale riduzione di glutazione intracellulare ed un'inattivazione di enzimi chiave nel mantenimento dello stato redox cellulare: Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi, Glutazione Reduttasi e Glutazione Perossidasi. Questo lavoro intende valutare eventuali modificazioni dell'attività metabolica dei polimorfonucleati mediante chemiluminescenza ed espressione di recettori di membrana specifici, in particolare CD45, CD62L e CD18.

Materiali e metodi. I PMNs sono stati isolati mediante il metodo di Boyum. L'estratto acquoso del fumo di sigaretta, a-CSE, è stato preparato facendo gorgogliare, tramite una pompa ad acqua, il fumo di una sigaretta in 4 mL di tampone fosfato (KRP).

Chemiluminescenza: Per i test di chemiluminescenza sono state utilizzate come sonde il luminol e la lucigenina. Le misure di funzionalità dei PMNs (incubati con a-CSE e con KRP) sono state effettuate su un luminometro automatico (Berthold LB 953).

Citofluorimetria: i PMNs dopo essere stati cimentati con anticorpi anti CD45, CD18 e CD62 sono stati incubati con a-CSE a 37° C. Le misure sono state effettuate a 0, 15 e 30 minuti, utilizzando un citofluorimetro a flusso (Epics Beckman-Coulter).

Risultati L'estratto acquoso del fumo di sigaretta induce una significativa inibizione della chemiluminescenza, sia luminol che lucigenina dipendente, ed una immediata attivazione degli stessi che si evidenzia come una maggiore espressione di CD18.

Discussione. Dai risultati di chemiluminescenza risulta che l'effetto nocivo del fumo di sigaretta si traduce in un'incapacità dei PMNs di esercitare una delle funzioni peculiari, la fagocitosi; allo stesso tempo, l'analisi citofluorimetrica indica anche un'attivazione immediata e precoce al fumo che potrebbe alterare la fisiologica risposta immunitaria e causare un diretto effetto del fumo di sigaretta sulle cellule epiteliali delle vie aeree e del polmone.

298

UREA BREATH TEST IN NDIRS: FOLLOW UP DELLE INFEZIONI DA H. PYLORI ASSOCIATE AD ORTICARIA CRONICA IDIOPATICA.

Spagnuolo S.°, Guzzo A.°, Niola O.°, Orefice S.°, Piccolo C.°, Prisco C.*, Ricciardi C.*, Dente B.°

°Unità Operativa Complessa di Medicina di Laboratorio; *Day Hospital Farmacoallergia-Allergologia - P.O. "San Paolo" ASL 1 Napoli.

Introduzione. Le infezioni gastriche da *Helicobacter pylori* sono frequentemente associate all'orticaria cronica idiopatica. La loro eradicazione porta, nella maggior parte dei casi, ad una completa scomparsa dei sintomi clinici.

Materiali e metodi. Nel percorso individuato per gli utenti che si rivolgono al Day Hospital di Farmacoallergia-Allergologia del nostro ospedale è contemplato un ampio profilo ematochimico che testa, oltre ai comuni indici metabolici ed immunoallergici, la funzionalità tiroidea, l'eventualità di malattia celiaca e quella di una infezione da *Helicobacter pylori* (H.p.).

In particolare, presso il nostro Laboratorio pratichiamo l'Urea breath test in NDIRS (IRIS - Altana), per la diagnosi ed il monitoraggio, dopo trattamento, dell'infezione da H. p.

Risultati. In quasi due anni di attività sono afferiti all'ambulatorio della ns. U.O.C. 412 utenti (M=85; F=327) (età media 48 anni, con range:13-83).

Alta è stata la positività all'UBT (217 pazienti, pari al 53 %).

Tra gli UBT-positivi sono stati selezionati 34 soggetti, affetti da prurito cronico, con manifestazioni orticarioidi ricorrenti, i quali sono stati sottoposti a terapia eradicante e a successivo monitoraggio.

Al controllo effettuato dopo un mese dal termine della terapia, tutti i 34 soggetti sono risultati H.p.- negativi all'UBT, mostrando contemporaneamente all'esame clinico la completa remissione dei sintomi.

Conclusioni. L'Urea breath test in NDIRS ha confermato l'alto grado di sensibilità e specificità nel monitoraggio dell'eradicazione dell'infezione da H.p.. I dati confermano l'evidenza di un'orticaria H.p.-dipendente. Tra le ipotesi di questa relazione ci sono l'attivazione del GALT (tessuto linfoide associato all'intestino), l'attivazione del complemento da parte di una tossina H.p. dipendente, la presenza di "releasing factors" dell'istamina da cellule della flogosi cronica. I risultati ottenuti invitano a proseguire nella valutazione di un possibile nesso di causalità tra infezioni da H.p. e fenomeni allergici.

Bibliografia.

1) Montemurro P., Nishioka H., Dundon W.G., Rappuoli R., Montecucco C. et al: The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells. Eur. J. Immunol.2002.32:671-676.

2) Nifosi G.: Orticaria cronica ed infezione da *Helicobacter pylori*: contributo casistico. Giorn. It. Allergol. Immunol. Clin. 8: 272, 1998.

299

VERIFICA DELLA COMMUTABILITÀ DEI SIERI NIST PER COLESTEROLO, ACIDO URICO, SODIO E POTASSIO (1)

Guerra E.¹, Carobene A.¹, Ceriotti F.¹, Ferrero C.A.¹, Roncoroni G.², Bossi G.², Suigo E.³, Rosso R.³, Manzato F.⁴, Chiozzi M.⁴, Zepponi E.⁵, Ursicino N.⁵, Schinella M.⁶, Giordani E.⁶, Bonvicini P.⁷, Venturini R.⁷, Plebani M.⁷

1 Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano

2 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Varese

3 Laboratorio Analisi, Az. Osp. "Ospedale civile di Legnano" - stabilimento di Magenta

4 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Mantova

5 Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rieti

6 Laboratorio Analisi, di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine, Rovereto (TN)

7 Servizio Medicina Laboratorio, Az. Ospedaliera, Padova

Nell'ambito di un progetto di verifica degli intervalli di riferimento è stata valutata la commutabilità dei sieri NIST 909b livello 1 e 2 per colesterolo, acido urico, sodio e potassio.

Materiali e metodi. Sistemi analitici: 5 sistemi Olympus e 2 sistemi Roche con reattivi dedicati.

Per ogni componente sono stati preparati 10 pool a diversi livelli di concentrazione, divisi in aliquote da 1 mL e congelati a -80°C. I sieri NIST sono stati ricostituiti da un unico centro, divisi in aliquote da 0,6 mL e congelati a -80°C. I 10 pool di sieri congelati, i due NIST e altri due pool di sieri congelati (IRA e IRB) sono stati distribuiti ai laboratori. Le analisi su strumentazione di routine sono state effettuate in duplicato per i pool umani e in triplicato per i materiali di controllo NIST, IRA e IRB. Presso il laboratorio di Milano sono state effettuate le determinazioni con metodi di riferimento, in un'unica serie analitica, in duplicato su tutti i materiali con l'eccezione di Sodio e Potassio, per i quali sia i pool umani sia i materiali di controllo sono stati analizzati in triplicato. Per ogni componente mostriamo i dati di 5 tra questi 7 laboratori comprendendo sempre i 2 laboratori che utilizzano sistemi Roche e 3 Olympus. **Risultati.** Per ogni componente sono state calcolate le regressioni lineari per ogni coppia di metodi, ottenute sui 10 pool di sieri umani congelati. Per ogni materiale sono stati calcolati gli scarti normalizzati dalla retta di regressione (distanza dalla retta divisa per il valore di Syx). Per ogni materiale è calcolata la media di tutti gli scarti normalizzati (dati mostrati in tabella) ottenuti nei diversi confronti verso il metodo di riferimento. Per valori < 3 il materiale è considerato commutabile.

	Colesterolo	Acido Urico	Na	K
NIST 1	-4.58	1.16	0.36	-0.11
NIST 2	-8.53	1.00	0.67	-1.80
IRA	1.35	-0.76	0.19	-0.87
IRB	-0.11	0.41	0.86	0.42

Conclusioni: Le prove di commutabilità sui materiali NIST per Acido Urico, Sodio e Potassio mostrano un comportamento commutabile di questi materiali sia per la strumentazione Roche che Olympus. Nel caso del Colesterolo i sieri NIST non sono risultati commutabili. ¹ Gabert J. et al. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57